illumina®

HiSeq® 4000 Systemhandbuch

NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE

ILLUMINA EIGENTUMSRECHTLICH GESCHÜTZT
Teile-Nr. 15066496 Rev. A DEU
Februar 2015

Katalognummer SY-401-9003DOC

Anpassen einer kurzen Ende-zu-Ende-Workflow-Anleitung mit dem Custom Protocol Selector
support.illumina.com/custom-protocol-selector.html

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und verbundenen Unternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen genau durch qualifiziertes und entsprechend ausgebildetes Personal ausgeführt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgen kann. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE SACHSCHÄDEN EINTRETEN.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN, ODER JEDER ANDEREN ART DER VERWENDUNG DER PRODUKTE AUSSERHALB DES GÜLTIGKEITSBEREICHS DER AUSDRÜCKLICHEN SCHRIFTLICHEN LIZENZEN ODER DER DURCH ILLUMINA GENEHMIGTEN ZULASSUNGEN IN VERBINDUNG MIT DEM ERWERB DER PRODUKTE DURCH DEN KUNDEN.

NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE

© 2015 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina, **24sure**, **BaseSpace**, **BeadArray**, **BlueFish**, **BlueFuse**, **BlueGnome**, **cBot**, **CSPro**, **CytoChip**, **DesignStudio**, **Epicentre**, **GAIIx**, **Genetic Energy**, **Genome Analyzer**, **GenomeStudio**, **GoldenGate**, **HiScan**, **HiSeq**, **HiSeq X**, **Infinium**, **iScan**, **iSelect**, **MiSeq**, **NeoPrep**, **Nextera**, **NextBio**, **NextSeq**, **Powered by Illumina**, **SeqMonitor**, **SureMDA**, **TruGenome**, **TruSeq**, **TruSight**, **Understand Your Genome**, **UYG**, **VeraCode**, **verifi**, **VeriSeq**, die kürbisorange Farbe und das Streaming-Basen-Design sind Marken von Illumina, Inc. und/oder ihren Tochtergesellschaften in den USA und/oder anderen Ländern. Alle anderen Namen, Logos und Marken sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis iii

Kapitel 1 Überblick 1

Einleitung 2
HiSeq 4000-Komponenten 3
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien 6
Starten des HiSeq 4000-Systems 7
HiSeq 4000-Software 8
Weitere Ressourcen 13

Kapitel 2 Durchführen eines Sequenzierungslaufs 15

Einleitung 16
Sequenzierungsworkflow 17
Eingeben von Laufparametern 18
Laden und Vorfüllen von Reagenzien 22
Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle 29
Überwachen des Laufs 33

Kapitel 3 Verfahren nach einem Lauf 35

Einleitung 36
Entladen und Wiegen von Reagenzien 37
Durchführen eines Wartungswaschlaufs 38
Durchführen eines Wasserwaschlaufs 41
Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks durchführen 43
Gerät in den Leerlauf versetzen 44
Ausschalten des Geräts 45

Kapitel 4 Echtzeitanalyse 47

Einleitung 48
Überblick über RTA v2 49
Echtzeitanalyse-Workflow 51
Sequenzierung von Ausgabedateien 55
Plattennummerierung 56

Kapitel 5 Fehlerbehebung 57

Einleitung 58
Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration 59
Durchführen einer Fluidikprüfung 60
Anhalten oder Abbrechen eines Laufs 61
Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B 63
Mögliche Primer-Rehybridisierung für Read 1 64

Index 65

Technische Unterstützung 69

Überblick

Kapitel 1

Einleitung 2
HiSeq 4000-Komponenten 3
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien 6
Starten des HiSeq 4000-Systems 7
HiSeq 4000-Software 8
Weitere Ressourcen 13

Einleitung

Das HiSeq®-System kombiniert innovative Technik mit bewährter SBS-Technologie und setzt damit neue Standards in puncto Leistung, Schlichtheit und Wirtschaftlichkeit.

Das HiSeq 4000-System umfasst die folgenden Funktionen:

- **Bildgebung von zwei Oberflächen**: Das HiSeq 4000-System verwendet ein Epifluoreszenzsystem mit zwei Kameras und vier Sensoren, das über eine moderne Scan-Technologie zur Darstellung von zwei Oberflächen ausgestattet ist.
- **Strukturierte Fließzelle**: Das HiSeq 4000-System verwendet eine strukturierte Fließzelle, die das Generieren von Sequenzierungs-Clustern in einer geordneten Anordnung ermöglicht. Dies sorgt für mehr Ausgabe-Reads und generierte Daten.
- **Zwei Fließzellen**: Das HiSeq 4000-System ist ein System für zwei Fließzellen, das die Durchführung von Sequenzierungen für eine oder beide Fließzellen gleichzeitig und mit unterschiedlichen Read-Längen ermöglicht.
- **Reagenzienkühler mit hoher Aufnahmekapazität**: Die Reagenzienkammer ist ein hochleistungsfähiger Kühler, der ausreichend Reagenzien für den gesamten Sequenzierungslauf aufnehmen kann.
- **Integrierte Fluidik für Paired-End-Läufe**: Die integrierte Paired-End-Fluidik liefert Reagenzien aus der Reagenzienkammer für die Read 2-Resynthese und die indizierte Sequenzierung an die Fließzelle.
- **Steuerungsoptionen auf der Benutzeroberfläche**: Die Benutzeroberfläche der Gerätesoftware bietet Optionen zum Einrichten des Laufs und Bedienen des Geräts über den Touchscreen-Monitor bzw. die integrierte Tastatur.
- **Base-Calling in Echtzeit**: Die Gerätesoftware extrahiert Intensitäten aus Bildern und führt das Base-Calling mit Qualitäts-Score auf dem Gerätecomputer durch, sodass Sie während des Laufs Qualitätskennzahlen überwachen können und bei der anschließenden Datenanalyse wertvolle Zeit sparen.

  Die nachgeschaltete Analyse von Sequenzierungsdaten kann mit Illumina-Analysesoftware oder Software-Programmen von Drittanbietern auf einer benutzerdefinierten Infrastruktur durchgeführt werden.
- **BaseSpace-Konnektivität**: Das HiSeq 4000-System bietet eine Funktion zum Senden von Gerätezustands- und Sequenzierungsdaten an die BaseSpace-Genomik-Cloud-Lösung in Echtzeit, um die Gerätequalitätskontrolle und Analyse zu optimieren.

HiSeq 4000-Komponenten

Das HiSeq 4000-System besteht aus dem Gerät, dem Bildschirm, dem Gerätesteuerungscomputer und Zubehör wie einer Tastatur, einer Maus, einem Universal-Netzteil und einem Barcodescanner. Das Gerät enthält vier Hauptkammern: das Optikmodul, die Fließzellenkammer, die Fluidikkammer und die Reagenzienkammer. Der Betriebsstatus des Geräts ist auf einer beleuchteten Statusleiste ersichtlich.

Abbildung 1 Externe Komponenten

- **A** **Optikmodul**: Enthält optische Komponenten, die die Darstellung zweier Oberflächen der Fließzelle ermöglichen, indem A, C, G und T gleichzeitig mithilfe von Epifluoreszenz aufgenommen werden. Der Anregungslaserstrahl tritt durch das Objektiv und die Fluoreszenz wird vom selben Objektiv erfasst.
- **B** **Fließzellenkammer**: Enthält den vakuumgesteuerten Fließzellentisch, der die Fließzelle während des Sequenzierungslaufs in Position hält.
- **C** **Fluidikkammer**: Enthält Fluidikpumpen, die die Reagenzien in die Fließzelle und anschließend in den Abfallbehälter leiten.
- **D** **Statusleiste**: Zeigt den Gerätestatus anhand von drei Farben an. Blau bedeutet, dass das Gerät läuft, Orange weist darauf hin, dass das Gerät überprüft werden muss, und Grün zeigt an, dass das Gerät für den nächsten Lauf bereit ist.
- **E** **Reagenzienkammer**: Enthält Reagenzien-Racks mit Reagenzien für Sequenzierungsläufe und die Waschlösung für Gerätewaschläufe.

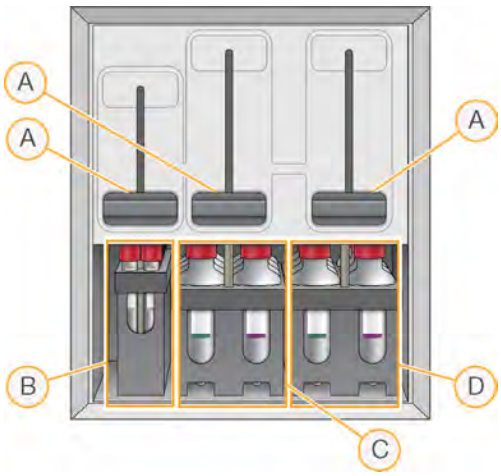
Reagenzienkammer

Bei der Reagenzienkammer handelt es sich um einen Reagenzienkühler mit drei Reagenzien-Racks: zwei Racks für SBS-Reagenzien und einen Rack für Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien. Mithilfe der Sippergriffe werden die Sipper in die Reagenzienflaschen abgesenkt.

- **SBS-Reagenzien-Racks**: Fassen konische 250-ml-Flaschen. Der Reagenzien-Rack für Fließzelle A befindet sich in der Mitte und der Rack für die Fließzelle B liegt ganz rechts. Die Nummern der Positionen auf dem Reagenzien-Rack entsprechen den Anschlüssen auf einem internen Reagenzien-Selektor-Ventil.
- **Rack für Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien**: Befindet sich in der linken Position. Er verfügt über zwei Reihen mit nummerierten Positionen, die konische 15-ml-Röhrchen mit Paired-End-Reagenzien und Indizierungsreagenzien enthalten. Die linke Reihe enthält die Reagenzien für Fließzelle A und die rechte Reihe die Reagenzien für Fließzelle B.

- **Reagenzienkühler**: Die Reagenzien-Racks sind im Reagenzienkühler untergebracht, in dem eine Innentemperatur von 2 °C bis 8 °C herrscht.

Abbildung 2 Reagenzienkammer

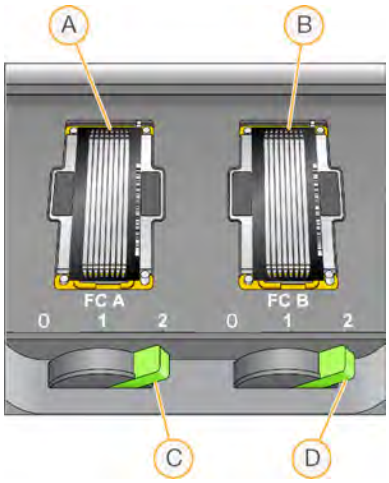


A Sippergriffe
B Reagenzien-Rack für Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien
C Reagenzien-Rack für SBS-Reagenzien für Fließzelle A
D Reagenzien-Rack für SBS-Reagenzien für Fließzelle B

Fließzellenkammer

In der Fließzellenkammer sind der Fließzellentisch, die thermischen Stationen, das Vakuumsystem und die Fluidikanschlüsse für die einzelnen Fließzellen untergebracht.

Abbildung 3 Fließzellentisch mit zwei Fließzellen



A Fließzelle A
B Fließzelle B
C Fließzellenregler A
D Fließzellenregler B

Auf der linken Seite ist Fließzelle A und auf der rechten Seite ist Fließzelle B dargestellt.

Jede Fließzelle befindet sich auf dem Fließzellentisch, der von der Steuerungssoftware in das optische Modul hineingefahren bzw. aus diesem herausgefahren wird. Der Fließzellentisch muss in der vordersten Position positioniert sein, um die Tür der Fließzellenkammer öffnen zu können und eine Fließzelle einzusetzen oder zu entfernen.

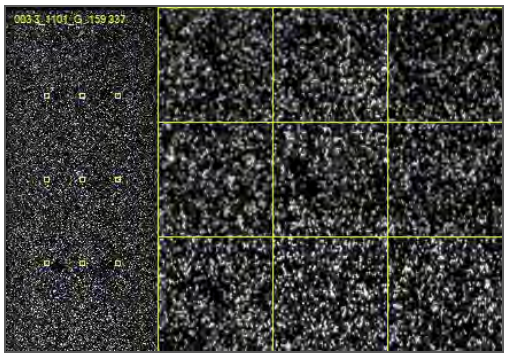
Die Fließzelle befindet sich auf dem Fließzellenhalter, wobei die Einlass- und Auslassöffnungen nach unten zeigen, und wird durch das Vakuum unter jedem Fließzellenhalter in Position gehalten. Der beleuchtete Fließzellenregler, der sich vor jedem Fließzellenhalter befindet, steuert das Vakuum. Wenn der Fließzellenregler grün leuchtet, sitzt die Vakuumdichtung sicher.

Strukturierte Fließzelle

Die auf dem HiSeq 4000-System verwendete Fließzelle ist eine strukturierte Fließzelle mit Milliarden von geordneten Nanowells. Die Wells sind in das Glas der Fließzelle eingearbeitet, wodurch das Generieren von Sequenzierungs-Clustern in einer geordneten Struktur ermöglicht wird. Die Cluster sind eng aneinander ausgerichtet, was die Anzahl der Ausgabe-Reads und die Menge der generierten Daten erhöht. Die strukturierte Fließzelle enthält acht Lanes mit zwei Bildstreifen pro Lane und hat die gleichen allgemeinen Maße wie andere HiSeq-Hochleistungs-Fließzellen.

Die strukturierte Fließzelle ist im Lieferumfang des HiSeq 3000/4000-PE-Cluster-Kits enthalten. Sie wird in trockenem Zustand in einem mit Folie verpackten Paket geliefert. Innerhalb des in Folie verpackten Pakets befindet sich die Fließzelle zusätzlich in einer aufklappbaren Schachtel aus Kunststoff.

Abbildung 4 Beispiel: Cluster auf einer strukturierten Fließzelle



Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

Zum Sequenzieren auf dem HiSeq 4000-System sind Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien aus den Illumina-Kits erforderlich.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Alkoholtupfer, 70 % Isopropyl oder Ethanol, 70 %	VWR, Katalognr. 95041-714 Allgemeiner Laborlieferant	Reinigen der Fließzelle und des Fließzellentisches.
Ballonflasche, Fassungsvermögen mindestens 6 Liter	Allgemeiner Laborlieferant	Vorbereitung der Lösung für den Wartungswaschlauf.
250-ml-Zentrifugenröhrchen	Corning, Katalognr. 430776	Gerätewartungswaschlauf und Wasserwaschlauf.
Konische 15-ml-Röhrchen	Corning, Katalognr. 430052	Sammeln und Messen der Abfallvolumina. Gerätewartungswaschlauf und Wasserwaschlauf.
Konische 50-ml-Röhrchen, selbststehend (optional)	Corning, Katalognr. 430921	Lagern der Fließzellen.
Einweg-Handschuhe, ungepudert	Allgemeiner Laborlieferant	Allgemeine Verwendung.
Labortücher, fusselfrei	VWR, Katalognr. 21905-026	Reinigen des Fließzellenhalters.
Linsenpapier, 4 x 6 Zoll (10,2 x 15,2 cm)	VWR, Katalognr. 52846-001	Reinigen der Fließzelle.
Pipettenspitzen, 200 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Aufteilen von Reagenzienvolumina.
Pipettenspitzen, 1000 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Aufteilen von Reagenzienvolumina.
ProClin 300, 50 ml	Sigma-Aldrich, Katalognr. 48912-U	Gerätewartungswaschlauf.
Tween 20, viskose Flüssigkeit, 100 ml	Sigma-Aldrich, Katalognr. P7949	Gerätewartungswaschlauf.
Pinzette, viereckige Kunststoffspitze	McMaster-Carr, Katalognr. 7003A22	Entfernen der Fließzellen-Dichtungen.
Wasser, Laborqualität, 18 M Ohm	Millipore	SBS- und PE-Reagenzien-Racks, Positionen mit PW1. Gerätewaschlauf.

Starten des HiSeq 4000-Systems

1. Starten Sie den Gerätesteuerungscomputer.
2. Melden Sie sich mit dem Standard-Benutzernamen und dem Standard-Kennwort beim Betriebssystem an.
   - Benutzername: sbsuser
   - Kennwort: sbs123

   Warten Sie ab, bis das Betriebssystem geladen wurde. Wenn die Anmeldung mit den Standarddaten fehlschlägt, erkundigen Sie sich bei Ihrem zuständigen Administrator nach dem Benutzernamen und dem Kennwort für Ihren Standort.
3. Bringen Sie den Hauptnetzschalter in die EIN-Position. Wenn Sie vor dem Gerät stehen, befindet sich der Netzschalter auf der linken Seite.
4. Warten Sie mindestens eine Minute, bis das Gerät ordnungsgemäß konfiguriert und das Gerätelaufwerk „DoNotEject“ initialisiert ist. Während der Initialisierung des Laufwerks wird ein entsprechendes Fenster geöffnet. Schließen Sie das Fenster. Falls sich das Fenster nicht öffnet, suchen Sie unter „Arbeitsplatz“ nach dem Gerätelaufwerk „DoNotEject“.

   HINWEIS
   Werfen Sie niemals das Flash-Laufwerk „DoNotEject“ aus, das sich im Gehäuse des Geräts befindet, und ändern Sie nicht die darauf gespeicherten Dateien. Das Laufwerk enthält Hardwarekonfigurationsdateien und wird jedesmal initialisiert, wenn Sie das Gerät einschalten.
5. Archivieren Sie die auf dem Gerätecomputer befindlichen Daten aller vorherigen Läufe in einem Netzwerkverzeichnis. So wird sichergestellt, dass ausreichend freier Speicherplatz vorhanden ist.
6. Öffnen Sie die HiSeq Control Software (HCS) mithilfe des Symbols auf dem Computer-Desktop. Die Initialisierung der Steuerungssoftware nimmt einige Minuten in Anspruch. Wenn die Initialisierung der Software abgeschlossen ist, wird der Begrüßungsbildschirm geöffnet. Links unten im Bildschirm wird das Initialisierungssymbol

angezeigt.

Gerätesteuerungscomputer: Best Practices

- Schalten Sie den Computer nicht ein, während das Gerät läuft. Schalten Sie immer zuerst den Computer ein, bevor Sie das Gerät einschalten.
- Schalten Sie das Gerät nicht aus, während die Gerätesteuerungssoftware läuft.
- Warten Sie nach dem Ausschalten des Geräts eine Minute, bevor Sie es wieder einschalten.
- Schließen Sie die USB-Kabel des Geräts, des Bildschirms und der Tastatur an die USB-Ports auf der Rückseite des Computers an, bevor Sie den Computer einschalten.
- Schließen Sie die USB-Kabel des Barcodescanners und der Maus an die USB-Ports auf der Vorderseite des Computers an.

HiSeq 4000-Software

Auf dem Gerätecomputer sind drei Software-Anwendungen installiert:

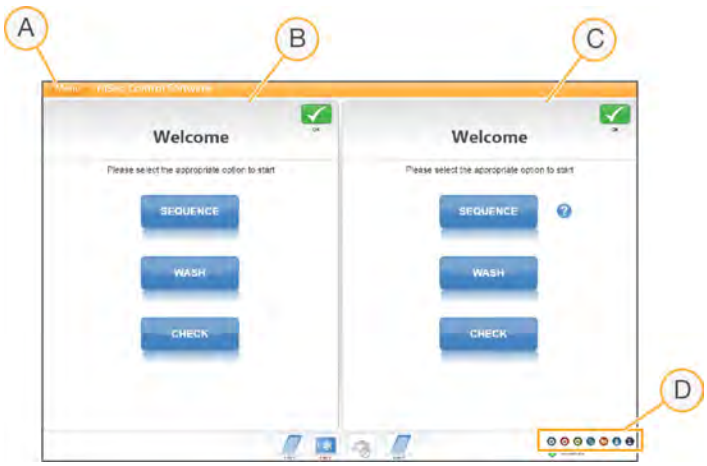
- **HiSeq 4000 Control Software**: Die Benutzeroberfläche der HiSeq Control Software (HCS) führt Sie durch die Schritte für die Einrichtung eines Sequenzierungslaufs. Während des Laufs steuert die Software die Geräte-Hardware und die Fluidik, legt Temperaturen fest und liefert eine visuelle Zusammenfassung von Qualitätsstatistikwerten.
- **Echtzeitanalyse-Software**: Die in die Steuerungssoftware integrierte Echtzeitanalyse (RTA)-Software führt das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Zyklus einen Qualitäts-Score zu. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Echtzeitanalyse* auf Seite 47.
- **Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software**: Der Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) liefert detaillierte Qualitätsstatistikwerte.

Benutzeroberfläche der HiSeq 4000 Control Software

Der Begrüßungsbildschirm ist in zwei Bereiche unterteilt: einen für jede Fließzelle. Sie können über die Benutzeroberfläche der Software einen Lauf für Fließzelle A und einen Lauf für Fließzelle B parallel einrichten. Sie können auch voneinander unabhängige Läufe über die Benutzeroberfläche der Software konfigurieren.

Im Begrüßungsbildschirm stehen Befehle zum Starten eines Sequenzierungslaufs, Waschen des Geräts und Durchführen einer Systemprüfung zur Verfügung. Nach Abschluss eines Laufs werden Sie aufgefordert, einen Waschlauf für das Gerät durchzuführen. Nach dem Waschlauf zeigt die Software wieder den Begrüßungsbildschirm an.

Abbildung 5 Begrüßungsbildschirm



A Menüschaltfläche des Begrüßungsbildschirms
B Benutzeroberflächenbereich für Fließzelle A
C Benutzeroberflächenbereich für Fließzelle B
D Aktivitätsanzeigen

Befehle des Begrüßungsbildschirms

Zu den Befehlen des Begrüßungsbildschirms gehören „Sequence“ (Sequenzieren), „Wash“ (Waschlauf) und „Check“ (Prüfen).

- **Sequence** (Sequenzieren): Wählen Sie **Sequence** (Sequenzieren), um einen neuen Sequenzierungslauf einzurichten.

  Abbildung 6 Optionen unter „Sequence“ (Sequenzierung)

- **Wash** (Waschlauf): Wählen Sie **Wash** (Waschlauf), um einen Gerätewaschlauf oder einen Wartungswaschlauf zu starten.

  Abbildung 7 Optionen unter „Wash“ (Waschlauf)

  - **Water Wash** (Wasserwaschlauf): Bei einem Wasserwaschlauf wird das System mit Wasser gespült. Ein Wasserwaschlauf ist erforderlich, wenn das Gerät seit mindestens einem Tag nicht verwendet wurde. Er kann optional nach jedem Sequenzierungslauf durchgeführt werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Durchführen eines Wasserwaschlaufs* auf Seite 41.
  - **Maintenance Wash** (Wartungswaschlauf): Der Wartungswaschlauf spült Tween 20 und ProClin 300 durch das System. Dieser Waschlauf ist alle zehn Tage erforderlich und wird nach einem Sequenzierungslauf empfohlen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Durchführen eines Wartungswaschlaufs* auf Seite 38.

- **Check** (Prüfung): Wählen Sie die Option **Check** (Prüfung), um bei der Geräteinstallation oder der Behebung von Fluidik-Fehlern den Bildschirm für die Fluidikprüfung zu öffnen und den ordnungsgemäßen Fluss zu überprüfen.

Aktivitäts- und Sensoranzeigen

In der unteren rechten Ecke des Begrüßungsbildschirms befinden sich mehrere Symbole, die mithilfe von Gerätesensoren die Geräteaktivität und den Status bestimmter Komponenten angeben.

Abbildung 8 Aktivitätsanzeigen

Von links nach rechts befinden sich Aktivitätsanzeigen für die X-, Y- und Z-Motoren, die Elektronik-Funktionalität, die Kamera, das Fluidiksystem und Verarbeitungsfunktionen.

Abbildung 9 Sensoranzeigen

Von links nach rechts stellen Sensoranzeigen die Temperatur der Fließzelle A, die Temperatur des Reagenzienkühlers, den Cloud-Status von BaseSpace und die Temperatur von Fließzelle B dar.

Statussymbole

In der oberen rechten Ecke jedes Bildschirms befinden sich Statussymbole, die Sie über Änderungen der Bedingungen, Fehler oder Warnungen während der Laufkonfiguration oder des Laufs informieren.

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Status OK	Keine Änderung. Das System funktioniert normal.
	Information	Nur zur Information. Es ist keine Aktion erforderlich.
	Achtung	Informationen, die möglicherweise Ihre Aufmerksamkeit erfordern.
	Warnung	Warnungen stoppen einen Lauf nicht, erfordern jedoch möglicherweise eine Aktion, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Fehler	Fehler stoppen einen Lauf in der Regel und erfordern im Allgemeinen eine Aktion, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.

Wenn eine Bedingungsänderung auftritt, blinkt das entsprechende Symbol, um Sie darauf aufmerksam zu machen. Zum Beheben des Alarms wählen Sie das Symbol aus, um das Statusfenster zu öffnen. Dort finden Sie eine allgemeine Beschreibung der Bedingung. Wählen Sie **Acknowledge** (Bestätigen), um die Meldung zu akzeptieren, und **Close** (Schließen), um das Dialogfeld zu schließen.

Menü des Begrüßungsbildschirms

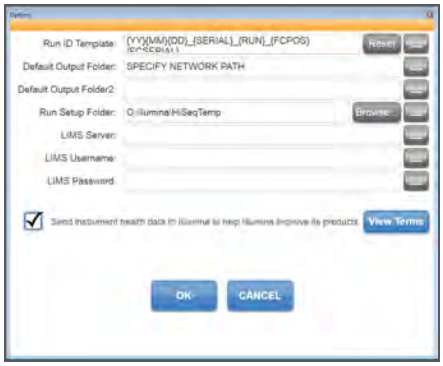
Die Menüschaltfläche des Begrüßungsbildschirms, die sich in der oberen linken Ecke des Begrüßungsbildschirms befindet, bietet folgende Optionen:

- **View** (Ansicht): Bietet Optionen zum Anzeigen der Benutzeroberfläche im Vollbildmodus oder in einem Fenster sowie zum Minimieren der Benutzeroberfläche.
- **Tools** (Werkzeuge): Bietet Zugriff auf das Fenster „Options“ (Optionen) und die Option „Show Log“ (Protokoll anzeigen):
  - **Options** (Optionen): Im Fenster „Options“ (Optionen) können Sie die Standardeinstellungen für Ihren Lauf festlegen. Weitere Informationen hierzu finden Sie im *Fenster mit Menüoptionen*.
  - **Show Log File** (Protokolldatei anzeigen): In dieser Datei werden alle Fehler festgehalten, die in der Steuerungssoftware auftreten. Verwenden Sie diese Protokolldatei zu Fehlerbehebungszwecken.
- **Scanner**: Aktiviert den Befehl zum manuellen Initialisieren der Software.
- **About** (Info): Bietet Informationen zur Geräte-Hardware und den Software-Versionen sowie Kontaktinformationen für technische Unterstützung.
- **Exit** (Beenden): Schließt die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.

Fenster mit Menüoptionen

Das Fenster mit Menüoptionen stellt Einstellungen bereit, mit denen die Lauf-ID-Vorlage, die Standardspeicherorte der Ordner, ein LIMS-Server, der Benutzername und das Kennwort festgelegt werden können. Außerdem enthält es die Möglichkeit anzugeben, ob die Gerätestatusinformationen an Illumina übermittelt werden sollen.

Abbildung 10 Fenster mit Menüoptionen



- **Run ID Template** (Lauf-ID-Vorlage): Die Namenskonvention, die zum Generieren von Laufordnernamen verwendet wird.
- **Default Output Folder** (Standardausgabeordner): Der Standardspeicherort, in dem Läufe der Fließzelle A gespeichert werden.
- **Default Output Folder2** (Standardausgabeordner2): Der Standardspeicherort, in dem Läufe der Fließzelle B gespeichert werden.

  HINWEIS
  Illumina empfiehlt einen Speicherort im Netzwerk für die Ausgabeordner. Sie können jedoch auch einen Speicherort auf dem Laufwerk O:\ angeben, sofern sich der Speicherort vom Ordner „HiSeq Temp“ unterscheidet. Verwenden Sie nicht das Laufwerk S:\. Dieses Laufwerk ist für den Betrieb des Geräts reserviert.

- **Default Temp Folder1** (Standard-Temp-Ordner1): Der Speicherort, in den während eines Laufs temporäre Dateien geschrieben werden. Der Ordner „HiSeq Temp“ wird auf das Laufwerk O:\ geschrieben.
- **Run Setup Folder** (Laufeinrichtungsordner): Der Speicherort der LIMS-Probeformulare.
- **LIMS Server** (LIMS-Server): Der Name des Servers für Interaktionen mit dem unterstützten Illumina-LIMS.
- **LIMS User name** (LIMS-Benutzername): Der Benutzername, der für die Authentifizierung beim Illumina-LIMS verwendet wird.
- **LIMS Password** (LIMS-Kennwort): Das Kennwort, das für die Authentifizierung beim Illumina-LIMS verwendet wird.
- **Send instrument health information to Illumina to aid technical support** (Gerätestatusinformationen an den technischen Support von Illumina senden): Erlaubt dem Gerät, Informationen für jeden Lauf an BaseSpace zu senden. Alle Informationen werden vertraulich behandelt. Illumina empfiehlt, diese Funktion zu aktivieren.

HiSeq 4000-Optionen zum Unterbrechen bzw. Abbrechen eines Laufs

Die Optionen zum Unterbrechen bzw. Abbrechen eines Laufs auf dem HiSeq 4000-System unterscheiden sich von den Optionen auf manchen anderen HiSeq-Geräten. Beim Beenden eines Laufs gibt es ***keine*** Option, den Lauf wieder aufzunehmen. Weitere Informationen finden Sie unter *Anhalten oder Abbrechen eines Laufs* auf Seite 61.

Überblick über das Probenblatt

Das Probenblatt ist eine benutzergenerierte Datei im *.csv-Format, in der Informationen zum Sequenzierungslauf gespeichert werden. Wenn der Lauf beginnt, kopiert die Software das Probenblatt in den Laufordner, wo es später zu Analysezwecken verwendet wird.

Probenblätter sind optional, es sei denn, Sie verwenden BaseSpace, um eine Datenanalyse durchzuführen. Verwenden Sie den Illumina Experiment Manager (IEM) zum Erstellen eines Probenblatts, ***bevor*** Sie den Lauf starten.

Verfügbarer Speicherplatz

Am Anfang des Laufs prüft die Software den freien Speicherplatz auf dem lokalen Laufwerk O:\ (Ausgabelaufwerk). Um einen Lauf durchzuführen, sind mindestens 2 TB erforderlich.

Wenn der verfügbare Speicherplatz während des Laufs den sicheren Grenzwert unterschreitet, stoppt die Software den Lauf und versetzt die Fließzelle in einen sicheren Status. Nachdem Speicherplatz verfügbar gemacht wurde, wird der Lauf automatisch fortgesetzt.

Illumina empfiehlt, eine Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks (O:\) durchzuführen, nachdem ein Lauf abgeschlossen ist, um das Laufwerk für den nachfolgenden Lauf zu löschen. Weitere Informationen finden Sie unter *Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks durchführen* auf Seite 43.

Weitere Ressourcen

Die folgenden Dokumente stehen auf der Website von Illumina zum Herunterladen zur Verfügung.

Ressource	Beschreibung
HiSeq 4000 und HiSeq 3000 Handbuch zur Standortvorbereitung (Teile-Nr. 15066492_DEU)	Enthält Spezifikationen für den Laborplatz, die elektrischen Anforderungen und die Umgebungsbedingungen.
HiSeq 4000 und HiSeq 3000 Sicherheits- und Compliance-Handbuch (Teile-Nr. 15066491_DEU)	Bietet Informationen zu Gerätekennzeichnungen und Compliance-Zertifizierungen sowie sicherheitsbezogene Informationen.
HiSeq 4000-Laborkontrollformular (Teile-Nr. 15058793_DEU)	Bietet eine interaktive Dokumentation von Lauftypen, Reagenzchargennummern, Gewicht der Reagenzien und abgegebenen Volumina für einen Lauf mit einer oder zwei Fließzellen.
Hiseq 3000/4000-Cluster-Kit Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15066495)	Enthält eine Beschreibung des Cluster-Kit-Inhalts sowie Anweisungen zum Vorbereiten von Verbrauchsmaterialien vor einem Sequenzierungslauf.
Hiseq 3000/4000-SBS-Kit Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15066494)	Enthält eine Beschreibung des SBS-Kit-Inhalts sowie Anweisungen zum Vorbereiten von Verbrauchsmaterialien vor einem Sequenzierungslauf.

Auf der HiSeq 4000-Supportseite der Illumina-Website können Sie auf Dokumentation, Software-Downloads, Online-Schulungen und häufig gestellte Fragen zugreifen.

Durchführen eines Sequenzierungslaufs

Kapitel 2

Einleitung 16
Sequenzierungsworkflow 17
Eingeben von Laufparametern 18
Laden und Vorfüllen von Reagenzien 22
Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle 29
Überwachen des Laufs 33

Einleitung

Um auf dem HiSeq 4000-System einen Lauf durchzuführen, bereiten Sie alle Reagenzien vor und halten Sie sich an die Eingabeaufforderungen der Software zum Einrichten des Laufs. Zu den Schritten für das Einrichten des Laufs gehören das Eingeben der Laufparameter, das Laden und Vorfüllen der Reagenzien, das Laden der Fließzelle und das Durchführen einer Fluidikprüfung.

Rufen Sie die Spezifikationen für das HiSeq 4000 auf der Illumina-Website auf, um Informationen über die Laufzeit sowie andere Performance-Spezifikationen zu erhalten.

Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

HiSeq 4000-Kit-Name	Katalognummer
HiSeq 3000/4000-SBS-Kit (300 Zyklen)	FC-410-1003
HiSeq 3000/4000-SBS-Kit (150 Zyklen)	FC-410-1002
HiSeq 3000/4000-SBS-Kit (50 Zyklen)	FC-410-1001

Vorbereitung der Fließzelle und der Reagenzien

Bevor Sie den Lauf einrichten, ***bereiten Sie alle Reagenzien für den Lauf vor***: SBS-Reagenzien, Indizierungsreagenzien und Paired-End-Reagenzien. Wenn Sie von der Software dazu aufgefordert werden, laden Sie alle Reagenzien. Sie müssen während des Laufs nicht zum Gerät zurückkehren, um Reagenzien zu laden.

Lagern Sie die verpackte Fließzelle mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur, bevor Sie die Folienverpackung entfernen.

Weitere Informationen finden Sie in den folgenden Handbüchern zur Reagenzienvorbereitung:

- *Hiseq 3000/4000-Cluster-Kit Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15066495)*
- *Hiseq 3000/4000-SBS Cluster-Kit Referenzhandbuch (Teile-Nr. 15066494)*

Gestaffelte Läufe

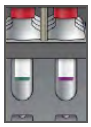
Sie können einen neuen Lauf auf Fließzelle A bzw. Fließzelle B starten, während auf der benachbarten Fließzelle gerade ein Lauf ausgeführt wird. Weitere Informationen finden Sie unter *Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B* auf Seite 63.

Sequenzierungsworkflow

Bereiten Sie die Fließzelle und die Reagenzien für den Lauf vor.

Weitere Informationen finden Sie unter *Vorbereitung der Fließzelle und der Reagenzien* auf Seite 16.

Geben Sie die Laufparameter gemäß den Anweisungen auf der Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware ein.

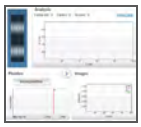


Wiegen Sie die Reagenzien. Laden Sie die SBS-Reagenzien für Read 1 und Read 2, die Indizierungsreagenzien (falls anwendbar) und die Paired-End-Reagenzien.

Überprüfen Sie mit einer gebrauchten Fließzelle den ordnungsgemäßen Fluss.

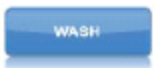
Füllen Sie die SBS-Reagenzien vor und messen Sie den Vorfüllabfall.

Laden Sie eine Hiseq 3000/4000-Cluster-Fließzelle und überprüfen Sie den ordnungsgemäßen Fluss.



Starten Sie den Sequenzierungslauf.

[Optional] Prüfen Sie nach Zyklus 2 den Bericht zur ersten Base und fahren Sie anschließend mit Read 1 fort.



Wenn der Lauf abgeschlossen ist, entladen und wiegen Sie die Reagenzien.

Führen Sie einen Gerätewaschlauf durch.

Eingeben von Laufparametern

Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm **Sequence** (Sequenzieren).

Die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware führt Sie durch die Schritte der Laufkonfiguration. Die Schritte für die Laufkonfiguration sind in drei Registerkarten unterteilt: „Run Configuration“ (Laufkonfiguration), „Pre-Run Setup“ (Vorlaufkonfiguration) und „Initiate Run“ (Lauf initiieren).

- Die Laufkonfigurationsbildschirme enthalten Dropdown-Listen, Kontrollkästchen oder Textfelder zur Angabe der Laufparameter. Scannen Sie die Fließzellen- oder Reagenzien-Kit-ID mit dem tragbaren Barcodescanner ein oder geben Sie die ID über die Touchscreen-Tastatur ein. Das Tastatursymbol befindet sich rechts neben den Textfeldern.
- Wählen Sie **Next** (Weiter), um zum nächsten Bildschirm zu wechseln, oder **Back** (Zurück), um zum vorherigen Bildschirm zurückzukehren.
- Sie können jederzeit während der Laufkonfiguration **Cancel** (Abbrechen) wählen, um die Laufkonfiguration zu beenden und zum Begrüßungsbildschirm zurückzukehren.

Bildschirm „Storage“ (Speicherung)

1. Wählen Sie **Connect to BaseSpace** (Mit BaseSpace verbinden), um den Lauf mit BaseSpace zu verbinden.
2. Wählen Sie eine Einstellung für BaseSpace aus:
   - **Storage and Analysis** (Speicherung und Analyse): Sendet zwecks Remote-Überwachung und Datenanalyse Laufdaten an BaseSpace. Zur Verwendung dieser Option ist ein Probenblatt erforderlich.

     HINWEIS
     Bevor Sie diese Option auswählen, vergewissern Sie sich, dass Sie über eine ausreichende Netzwerkbandbreite verfügen, um die Laufdaten an BaseSpace zu senden. Weitere Informationen finden Sie im *HiSeq 4000 und HiSeq 3000 Handbuch zur Standortvorbereitung (Teile-Nr. 15066492_DEU)*.

   - **Run Monitoring Only** (Nur Laufüberwachung): Sendet nur InterOp-Dateien an BaseSpace, sodass Sie Ihren Lauf remote überwachen können.

     HINWEIS
     Standardmäßig werden Base-Call-Dateien komprimiert und Q-Scores gruppiert, um den benötigten Speicherplatz zu reduzieren. Das Gruppieren von Q-Scores fasst Qualitätsbewertungen über einen größeren Bereich von Werten zusammen, ohne die Genauigkeit oder die Leistung zu beeinträchtigen.
3. Melden Sie sich mit der E-Mail-Adresse Ihres MyIllumina-Kontos und Ihrem Kennwort bei BaseSpace an.
4. Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum Speicherort des bevorzugten Ausgabeordners.
   Sie müssen einen Ausgabeordner angeben, auch wenn Sie BaseSpace zur Speicherung und Datenanalyse verwenden.
5. Stellen Sie sicher, dass die Miniaturbildeinstellung **Save All Thumbnails** (Alle Miniaturbilder speichern) lautet. Die Software speichert automatisch alle Miniaturbilder. Ein Miniaturbild ist eine Auswahl von Bildern aus vielen Platten in jeder Plattenspalte bzw. in jedem Bildstreifen, die in einem Miniaturbild zusammengefasst werden.

6 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Bildschirm „Flow Cell Setup“ (Einrichtung der Fließzelle)

Im Bildschirm „Flow Cell Setup“ (Einrichtung der Fließzelle) werden Informationen über die Fließzelle aufgezeichnet, die für Ihren Lauf verwendet wird. Alle Felder müssen ausgefüllt werden.

1 Scannen Sie den Fließzellenbarcode ein oder geben Sie die Fließzellen-ID (Barcodenummer) der zu sequenzierenden Fließzelle ein. Die Fließzellen-ID wird verwendet, um den Fließzellentyp und die Reagenzienkompatibilität festzustellen.

2 Vergewissern Sie sich, dass der Fließzellentyp **Hiseq 3000/4000 PE Flow Cell** (HiSeq 3000/4000 PE-Fließzelle) ist. Der Fließzellentyp wird automatisch auf Basis der Fließzellen-ID ausgewählt.

3 Geben Sie einen Namen für den Versuch ein. Der Name des Versuchs erscheint auf jedem Bildschirm, um den gerade durchgeführten Lauf zu identifizieren.

4 Geben Sie den Benutzernamen ein.

5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Bildschirm „Advanced“ (Erweitert)

1 [Optional] Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Confirm First Base** (Erste Base bestätigen).
Ein Bericht zur ersten Base wird automatisch für jeden Lauf nach Zyklus 2 generiert und im Stammverzeichnis des Laufordners gespeichert. Wenn Sie diese Option wählen, können Sie den Bericht bestätigen, bevor Sie mit dem Lauf fortfahren. Anderenfalls wird der Lauf fortgesetzt, ohne dass das Bestätigungsdialogfeld angezeigt wird.

2 [Optional] Wählen Sie im Fließzellenbild diejenigen Lanes aus, die Sie vom Lauf entfernen möchten. Standardmäßig werden keine Lanes entfernt.

HINWEIS
Das PhiX-Alignment wird für alle Lanes automatisch durchgeführt.

3 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Rezeptbildschirm

Aus den im Rezepturbildschirm eingegebenen Informationen wird automatisch eine Rezeptur generiert.

1 Wählen Sie eine Index-Option aus:
- **No Index** (Kein Index): Führt einen nicht indizierten Paired-End-Lauf durch.
- **Single Index** (Einfacher Index): Führt einen Paired-End-Lauf mit einem Index-Read durch.
- **Dual Index** (Doppelter Index): Führt einen Paired-End-Lauf mit zwei Index-Reads und Paired-End-Resynthese durch.
- **Custom** (Benutzerdefiniert): Führt einen Paired-End-Lauf mit einer benutzerdefinierten Anzahl an Zyklen für die Index-Reads durch.

2 Geben Sie die Anzahl der Zyklen für Read 1 und Read 2 ein.

Wenn Sie die Indizierungsoption **Custom** (Benutzerdefiniert) ausgewählt haben, geben Sie die Anzahl der Zyklen für jeden Index-Read ein. (Read-Längen müssen nicht identisch sein.)

3 Überprüfen Sie die folgenden Standardeinstellungen für die Chemie. Diese Felder werden entsprechend dem gewählten Indextyp automatisch ausgefüllt.

a **SBS**: **Hiseq 3000/4000 SBS Kit (Hiseq 3000/4000-SBS-Kit)**: Gibt die SBS-Chemie an, die für Read 1 und Read 2 verwendet wird.

b **Index**: **Hiseq 3000/4000 Sequencing Primer (Hiseq 3000/4000-Sequenzierungs-Primer)** oder **HiSeq 3000/4000 Dual Index Sequencing Primer (HiSeq 3000/4000-Doppel-Index-Sequenzierungs-Primer)**: Gibt die Chemie an, die für Index-Reads verwendet wird.

c **PE Turnaround**: **HiSeq 3000/4000 PE** oder **HiSeq 3000/4000 PE Dual Index (HiSeq 3000/4000-PE-Doppel-Index)**: Gibt die Chemie an, die für die Paired-End-Resynthese verwendet wird.

4 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Existing Recipe** (Vorhandene Rezeptur), wenn Sie eine benutzerdefinierte Rezeptur verwenden möchten. Lassen Sie ansonsten zu, dass die Software eine Rezeptur auf Basis der Informationen erstellt, die Sie in den Einrichtungsbildschirmen des Laufs eingegeben haben.
Illumina empfiehlt, den Rezepturassistenten zu verwenden, um die Rezeptur auf Basis der Informationen zu erstellen, die Sie im Rezepturbildschirm eingeben.

Bildschirm „Sample Sheet“ (Probenblatt)

Probenblätter sind optional, es sei denn, Sie verwenden BaseSpace, um eine Datenanalyse durchzuführen.

1 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen), um zum Speicherort der Probenblätter zu navigieren.

2 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Bildschirm „Reagents“ (Reagenzien)

Im Bildschirm „Reagents“ (Reagenzien) werden Informationen über das Reagenzien-Kit aufgezeichnet, das für Ihren Lauf verwendet wird.

1 Scannen Sie die Reagenzien-Kit-ID des SBS-Kits oder geben Sie sie in das Feld „Reagent Kit ID“ (Reagenzien-Kit-ID) ein:

2 Scannen Sie die PE-Reagenzien-Kit-ID oder geben Sie sie in das Feld „PE Reagent Kit ID“ (PE-Reagenzien-Kit-ID) ein.

3 Wählen Sie das SBS-Reagenzien-Kit für den Lauf aus:

- Wählen Sie **300 Cycles** (300 Zyklen) für ein Kit für 300 Zyklen. Die Anzahl der verbleibenden Zyklen ist standardmäßig 318.
- Wählen Sie **150 Cycles** (150 Zyklen) für ein Kit für 150 Zyklen. Die Anzahl der verbleibenden Zyklen ist standardmäßig 168.
- Wählen Sie **50 Cycles** (50 Zyklen) für ein Kit für 50 Zyklen. Die Anzahl der verbleibenden Zyklen ist standardmäßig 67.

HINWEIS
Das Feld „Cycles Remaining“ (Verbleibende Zyklen) wird anhand der SBS-Kit-ID automatisch ausgefüllt. Die Software zählt von der eingegebenen Zyklenanzahl abwärts. Ist die Zyklenanzahl gering, werden Sie aufgefordert, frische Reagenzien zu laden.

4 Wählen Sie **Prime SBS Reagents** (SBS-Reagenzien vorfüllen), um die Reagenzien vorzufüllen. Führen Sie immer einen Vorfüllvorgang aus, ***bevor*** Sie eine Cluster-Fließzelle laden.

5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Überprüfungsbildschirm

1 Überprüfen Sie auf dem Überprüfungsbildschirm die Laufparameter.

2 Wählen Sie **Next** (Weiter), um fortzufahren, oder **Back** (Zurück), um die Parameter zu ändern.

Laden und Vorfüllen von Reagenzien

Nach der Eingabe der Laufparameter sind die nächsten Schritte für die Laufkonfiguration das Laden der SBS-, Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien sowie das Vorfüllen der Reagenzien durch das Fluidiksystem. Die Software führt Sie in mehreren Voreinstellungsbildschirmen auf der Registerkarte „Pre-Run Setup“ (Vorlaufkonfiguration) durch diese Schritte.

Von Illumina bereitgestellte Verbrauchsmaterialien

- Acht Trichterverschlüsse

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

- 250-ml-Flasche (Corning, Katalognr. 430776)
- Konische 15-ml-Röhrchen (Corning, Katalognr. 430052)
- Wasser in Laborqualität

HINWEIS
Laden Sie zum Vorbereiten der Spülung nach dem Sequenzierungslauf 25 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität in Position 2.
Die Spülung nach dem Lauf ersetzt ***nicht*** den Gerätewaschlauf nach dem Lauf.

Laden von SBS-Reagenzien

1. Invertieren Sie jede Flasche mehrmals, um sicherzugehen, dass die Reagenzien gründlich gemischt werden.
2. Nehmen Sie den Verschluss von jeder Reagenzienflasche ab und setzen Sie einen Trichterverschluss auf.

   ACHTUNG!
   Nach dem Kontakt mit der HCM-Flasche müssen Sie die Handschuhe entsorgen und neue Handschuhe anziehen.

3. Halten Sie das Gewicht der einzelnen Reagenzien im Laborkontrollformular fest.

   HINWEIS
   Durch das Wiegen der Reagenzien vor und nach einem Sequenzierungslauf kann die tatsächliche Reagenzienzugabe ermittelt werden.

4. Öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer.
5. Heben Sie die Sipper für den Sequenzierungsreagenzien-Rack wie folgt an:
   a. Ziehen Sie den Griff zu sich hin und schieben Sie ihn dann nach oben.
   b. Schieben Sie den Sippergriff in die Aussparung am oberen Ende der Schiene. Vergewissern Sie sich, dass der Sippergriff fest in der Aussparung sitzt.
6. Schieben Sie den Reagenzien-Rack aus der Reagenzienkammer.
7. Platzieren Sie die einzelnen Reagenzienflaschen in die nummerierten Positionen des Racks. Stellen Sie sicher, dass sich die konische Seite der Flasche in der Aussparung auf dem Boden des Racks befindet.

Tabelle 1 SBS-Reagenzienpositionen

Position	Reagenzien	Beschreibung
1	HIM	HT-Inkorporations-Mischung
2	PW1	25 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität
3	HSM	HT-Scan-Mischung
4	HB1	HT-SBS-Puffer 1
5	HB2	HT-SBS-Puffer 2
6	HB2	HT-SBS-Puffer 2
7	HCM	HT-Aufspaltungsmischung
8	HB2	HT-SBS-Puffer 2

8 Geben Sie 25 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität in die Flasche in Position 2.

9 Schieben Sie den Reagenzien-Rack in die Reagenzienkammer, indem Sie ihn an der erhöhten Führung unten in der Kammer ausrichten.

10 Senken Sie die Sipper wie folgt in die Sequenzierungs-Reagenzienflaschen ab:
   a Ziehen Sie den Griff zu sich hin und drücken Sie ihn nach unten.
   b Inspizieren Sie die Sipper, um sicherzustellen, dass sie beim Eintauchen in die Trichterverschlüsse nicht verbogen werden.
   c Schieben Sie den Sippergriff in die Aussparung am unteren Ende der Schiene.

11 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] geladen).

Laden von Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien

1 Invertieren Sie jede Flasche mehrmals, um sicherzugehen, dass die Reagenzien gründlich gemischt werden.

2 Halten Sie das Gewicht der einzelnen Reagenzien im Laborkontrollformular fest.

3 Heben Sie die Sipper für den Paired-End-Reagenzien-Rack wie folgt an:
   a Ziehen Sie den Griff zu sich hin und schieben Sie ihn dann nach oben.
   b Schieben Sie den Griff in die Aussparung am oberen Ende der Schiene. Vergewissern Sie sich, dass der Griff fest in der Aussparung sitzt.

4 Schieben Sie den Reagenzien-Rack mithilfe des Rack-Griffs aus der Reagenzienkammer.

5 Stellen Sie konische 15-ml-Röhrchen mit 10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität in die Positionen 12, 18 und 19 des Paired-End-Racks.

6 Entfernen Sie die Verschlüsse von den einzelnen Reagenzröhrchen und stellen Sie das Röhrchen in die entsprechend nummerierte Position bzw. in die Position mit der Farbe, die der Farbe des Etiketts entspricht.

Tabelle 2 Positionen der Paired-End-Reagenzien

Position	Reagenzien	Beschreibung
10	HRM	HT-Resynthese-Mischung
11	HLM2	HT-Linearisierungs-Mischung 2
12	PW1	10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität
13	HAM	HT-Amplifikations-Mischung
14	HPM	HT-Amplifikations-Vormischung
15	HDR	HT-Denaturierungsmischung (enthält Formamid)
16	HP11	Primer-Mischung – Read 2

Position	Reagenzien	Beschreibung
17	HP14*	Indizierungsoligomischung
18	PW1	10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität
19	PW1	10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität

*HP14 ist nur für indizierte Läufe erforderlich. Falls HP14 nicht verwendet wird, laden Sie ein konisches 15-ml-Röhrchen mit 10 ml PW1 oder Wasser in Laborqualität.

7 Schieben Sie den Reagenzien-Rack in die Reagenzienkammer, indem Sie ihn an der erhöhten Führung unten in der Kammer ausrichten.

8 Senken Sie die Sipper wie folgt in die Paired-End-Reagenzröhrchen ab:
   a Ziehen Sie den Griff zu sich hin und drücken Sie ihn dann nach unten.
   b Inspizieren Sie die Sipper, um sicherzustellen, dass sie beim Eintauchen in die Röhrchen nicht verbogen werden.
   c Schieben Sie den Griff in die Aussparung am unteren Ende der Schiene.

9 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Vorfüllen von Reagenzien

Die Schritte zum Vorfüllen der Reagenzien umfassen das Reinigen des Fließzellenhalters, das Laden der Primer-Fließzelle, das Verifizieren des ordnungsgemäßen Flusses und abschließend das Starten des Vorfüllvorgangs.

Reinigen des Fließzellenhalters

1 Öffnen Sie die Tür der Fließzellenkammer.

ACHTUNG!
Es dürfen keine Flüssigkeiten auf der Tür der Fließzellenkammer oder dem Fließzellentisch abgestellt werden, wenn die Tür geöffnet ist. Verschüttete Flüssigkeiten in diesem Bereich können das Gerät beschädigen.

2 Stellen Sie sicher, dass sich der Fließzellenregler in der AUS-Position befindet.

Abbildung 11 Fließzellenregler in Position 0

3 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Latexhandschuhe an.

4 Wenn die Fließzelle aus einem vorherigen Lauf vorhanden ist, entfernen Sie sie und legen Sie sie in ein Röhrchen mit Lagerungspuffer oder Wasser in Laborqualität, damit sie nicht austrocknet. Sie können sie zur Prüfung des Flusses vor dem Einsetzen einer Cluster-Fließzelle verwenden.

5 Wischen Sie die Oberfläche des Fließzellenhalters vorsichtig mit einem Alkoholtupfer oder einem fusselfreien, mit Ethanol oder Isopropanol befeuchteten Tuch ab, bis er sauber ist.

ACHTUNG!
Es darf kein Alkohol in die Vakuumöffnungen oder auf die Umgebung der Manifolds gelangen. Reinigen Sie den Tisch ggf. mit einem fusselfreien Tuch.

6 Unterziehen Sie den Fließzellenhalter einer Prüfung, um sicherzustellen, dass sich keine Fussel auf dem Halter befinden und die Vakuumöffnungen nicht blockiert werden.

Abbildung 12 Positionen der Vakuumöffnungen

Laden einer Primer-Fließzelle

Laden Sie im Bildschirm „Load Priming Flow Cell“ (Primer-Fließzelle laden) eine ***gebrauchte*** Fließzelle für den Vorfüllvorgang. Wenn Sie die gebrauchte Fließzelle geladen haben, prüfen Sie, ob das Vakuum aktiviert ist.

HINWEIS
Illumina empfiehlt die Verwendung einer Fließzelle aus dem vorherigen Lauf, um die Reagenzien des nachfolgenden Laufs vorzufüllen oder nach dem Lauf einen Gerätewaschlauf durchzuführen.

1 Spülen Sie die gebrauchte Fließzelle mit Wasser in Laborqualität. Trocknen Sie die Fließzelle mit einem für Objektive geeigneten Reinigungstuch oder einem anderen fusselfreien Tuch ab.

2 Reinigen Sie die Fließzelle mit Alkoholtupfern und einem Reinigungstuch für Objektive.

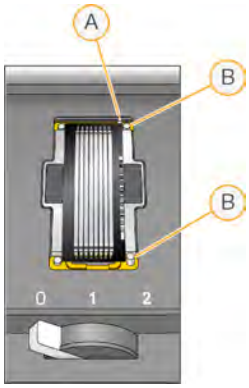
HINWEIS
Entfernen bzw. ersetzen Sie in diesem Schritt nicht die Fließzellen-Dichtungen.

3 Legen Sie die gebrauchte Fließzelle so auf den Fließzellenhalter, dass die Einlass- und Auslassanschlüsse nach ***unten*** weisen und der Barcode sich auf der rechten Seite befindet. Stellen Sie sicher, dass der Pfeil am linken Rand der Fließzelle, der die Flussrichtung angibt, in Richtung Gerät zeigt.

4 Schieben Sie die Fließzelle vorsichtig bis zum Anschlag in Richtung des oberen und der rechten Führungsstifte.

HINWEIS
Nehmen Sie die Hand von der Fließzelle, bevor Sie den Vakuumschalter betätigen. Dadurch wird verhindert, dass im Laufe der Zeit eine Verschiebung der Ausrichtung auftritt.

Abbildung 13 Fließzelle an oberem und rechten Führungsstiften ausgerichtet



A Oberer Führungsstift
B Rechte Führungsstifte

5 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 1. Dadurch wird das Vakuum aktiviert und die Fließzelle wird in Position gehalten. Wenn der Fließzellenregler grün blinkt, ist das Vakuum aktiviert. Falls der Regler nicht grün leuchtet, lesen Sie *Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration* auf Seite 59.

Abbildung 14 Fließzellenregler in Position 1

6 Warten Sie fünf Sekunden, und bewegen Sie dann den Fließzellenregler langsam in Position 2 (ganz rechts). Wenn der Fließzellenregler dauerhaft grün leuchtet, ist ein Vakuum entstanden und die Fließzelle ist einsatzbereit.

Abbildung 15 Fließzellenregler in Position 2

7 Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) auf dem Bildschirm für das Einsetzen der Primer-Fließzelle aktiviert ist, und wählen Sie dann die Option **Next** (Weiter).

Prüfen des Flusses

Bei der Überprüfung des Flusses wird auch festgestellt, ob die Fließzelle und die Dichtungen ordnungsgemäß installiert sind und Vakuum entstanden ist.

1 Wählen Sie Lösung 2 (Wasser in Laborqualität) aus der Dropdown-Liste.

ACHTUNG!
Verwenden Sie Wasser zur Prüfung des Flusses nur bei einer gebrauchten Fließzelle. Verwenden Sie niemals Wasser zur Prüfung des Flusses bei einer Cluster-Fließzelle.

2 Überprüfen Sie die folgenden Standardwerte:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Aspirationsrate): **250**
- Dispense Rate (Zufuhrrate): **2000**

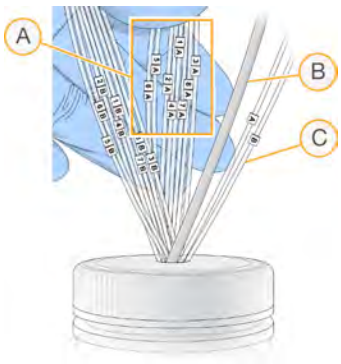
3 Wählen Sie **Pump** (Pumpe).

4 Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
Wenn Sie eine erhöhte Anzahl an Luftblasen feststellen, überprüfen Sie die Dichtungen auf Behinderungen, senken Sie die Aspirationsrate auf 100 und pumpen Sie weitere 125 µl Wasser in die Fließzelle. Wenn die Probleme weiterhin bestehen, entfernen Sie die Fließzelle, wiederholen Sie die Reinigungsschritte und setzen Sie die Fließzelle erneut ein.

Positionieren der Schläuche und Starten des Vorfüllvorgangs

1 Entfernen Sie die acht Abfallröhrchen der entsprechenden Fließzelle vom Abfallbehälter.
Entfernen Sie nicht die acht Röhrchen der gegenüberliegenden Fließzelle oder die Röhrchen der Kondensationspumpe oder der Paired-End-Vorfüllpumpen.

Abbildung 16 Positionieren der Schläuche



A Abfallröhrchen der Fließzelle für die Reagenzienpositionen 1 bis 8
B Schlauch der Kondensatpumpe (nicht entfernen)
C Schläuche der Paired-End-Vorfüllpumpe (nicht entfernen)

2 Platzieren Sie jeden Abfallschlauch in einem separaten leeren 15-ml-Röhrchen. Der Vorfüllabfall wird gesammelt und nach dem Vorfüllvorgang gemessen.

3 Wählen Sie **Start Prime** (Vorfüllvorgang starten). Der Vorfüllbildschirm wird geöffnet und der Vorfüllvorgang wird gestartet. Überwachen Sie den Status des Vorfüllvorgangs auf dem Vorfüllbildschirm.

4 Messen Sie nach Abschluss des Vorfüllvorgangs den gesammelten Abfall und überprüfen Sie, ob das Volumen in jedem Röhrchen 1,75 ml bzw. insgesamt **14 ml** beträgt. Das Gesamtvolumen wird wie folgt berechnet:
   - 250 µl für jede SBS-Position außer Position 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
   - 1,75 ml für jede Lane (1,75 x 8 = 14 ml)

5 Halten Sie die Ergebnisse im Laborkontrollformular fest.

6 Bevor Sie fortfahren, setzen Sie die Abfallschläuche wieder in den Abfallbehälter ein.

7 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle

Zu den Schritten zum Einsetzen der Cluster-Fließzelle gehören das Entfernen der zum Vorfüllen verwendeten Fließzelle, das Reinigen des Fließzellenhalters, das Reinigen und Einsetzen der Fließzelle in das Gerät sowie das Verifizieren des ordnungsgemäßen Flusses.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

- Reinigungstücher für Objektive
- 70%iges Ethanol oder Alkoholtupfer
- Fusselfreie Labortücher
- Eine Kunststoffzange

Entfernen der gebrauchten Fließzelle

1 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 1, um die Manifolds zu lösen.

Abbildung 17 Fließzellenregler in Position 1

2 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 0, um die Vakuumdichtung zu lösen und die Fließzelle freizugeben.

Abbildung 18 Fließzellenregler in Position 0

3 Heben Sie die gebrauchte Fließzelle aus der Halterung.

Reinigen des Fließzellenhalters

1 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Latexhandschuhe an.

2 Wischen Sie die Oberfläche des Fließzellenhalters vorsichtig mit einem Alkoholtupfer oder einem fusselfreien, mit Ethanol oder Isopropanol befeuchteten Tuch ab, bis er sauber ist.

ACHTUNG!
Es darf kein Alkohol in die Vakuumöffnungen oder auf die Umgebung der Manifolds gelangen. Reinigen Sie den Tisch ggf. mit einem fusselfreien Tuch.

Abbildung 19 Überprüfen der Vakuumöffnungen

3 Unterziehen Sie den Fließzellenhalter einer Prüfung, um sicherzustellen, dass sich keine Fussel auf dem Halter befinden und die Vakuumöffnungen nicht blockiert werden.

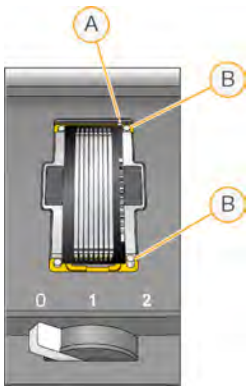
Einsetzen der Sequenzierungsfließzelle

HINWEIS
Ersetzen Sie die Manifold-Dichtungen nicht.

1 Legen Sie die Fließzelle so auf den Fließzellenhalter, dass die Einlass- und Auslassanschlüsse nach ***unten*** weisen und der Barcode sich auf der rechten Seite befindet. Stellen Sie sicher, dass der Pfeil am linken Rand der Fließzelle in Richtung Gerät zeigt.

2 Schieben Sie die Fließzelle vorsichtig bis zum Anschlag in Richtung des oberen und der rechten Führungsstifte.

Abbildung 20 Fließzelle an oberem und rechten Führungsstiften ausgerichtet



A Oberer Führungsstift
B Rechte Führungsstifte

HINWEIS
Nehmen Sie die Hand von der Fließzelle, bevor Sie den Vakuumschalter betätigen. Dadurch wird verhindert, dass im Laufe der Zeit eine Verschiebung der Ausrichtung auftritt.

3 Bewegen Sie den Fließzellenregler langsam in Position 1. Dadurch wird das Vakuum aktiviert und die Fließzelle wird in Position gehalten. Wenn der Fließzellenregler grün blinkt, ist das Vakuum aktiviert. Falls der Regler nicht grün leuchtet, lesen Sie *Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration* auf Seite 59.

Abbildung 21 Fließzellenregler in Position 1

4 Warten Sie fünf Sekunden, und bewegen Sie dann den Fließzellenregler langsam in Position 2. Wenn der Fließzellenregler dauerhaft grün leuchtet, ist ein Vakuum entstanden und die Fließzelle ist einsatzbereit.

Abbildung 22 Fließzellenregler in Position 2

5 Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) auf dem Bildschirm für das Laden der Sequenzierungsfließzelle aktiviert ist.

Prüfen des Flusses

Bei der Überprüfung des Flusses wird auch festgestellt, ob die Fließzelle und die Dichtungen ordnungsgemäß installiert sind und Vakuum entstanden ist.

1 Wählen Sie Lösung 5 aus der Dropdown-Liste.

2 Überprüfen Sie die folgenden Standardwerte:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Aspirationsrate): **250**
- Dispense Rate (Zufuhrrate): **2000**

3 Wählen Sie **Pump** (Pumpe).

4 Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
Wenn übermäßig viele Luftblasen vorhanden sind, überprüfen Sie die Manifold-Dichtungen auf Obstruktionen und wiederholen Sie den Vorgang mit Lösung 6, um zu

verhindern, dass die Lösung an Position 5 aufgebraucht wird. Senken Sie die Aspirationsrate auf 100 und pumpen Sie weitere 250 µl in die Fließzelle.

5 Wählen Sie **Next** (Weiter). Stellen Sie sicher, dass der Fließzellenregler grün leuchtet, und schließen Sie dann die Tür der Fließzellenkammer.

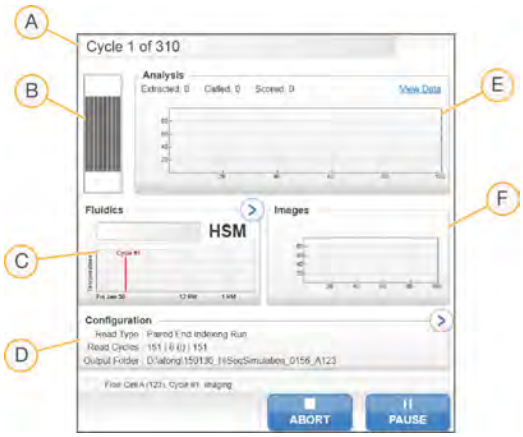
6 Achten Sie darauf, dass die Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) und **Door Closed** (Tür geschlossen) aktiviert sind, und wählen Sie **Next** (Weiter).

7 Wählen Sie **Start**, um den Sequenzierungslauf zu starten.

Überwachen des Laufs

Sie können die Laufkennzahlen, die Fluidik und die Bildgebung auf dem Laufübersichtsbildschirm überwachen.

Abbildung 23 Laufübersichtsbildschirm



A **Statusleiste**: In der Statusleiste können Sie prüfen, wie viele Zyklen bereits abgeschlossen sind.

B **Fließzellenbild**: Im Fließzellenbild sehen Sie, welche Lanes bereits aufgenommen wurden.

C **Fluidikdiagramm**: Erweitern Sie den Fluidikabschnitt und überwachen Sie die chemischen Schritte.

D **Laufkonfiguration**: Überprüfen Sie die Parameter des aktuellen Laufs.

E **Analysediagramm**: Überprüfen Sie die Qualitäts-Scores pro Zyklus.

F **Bilddiagramm**: Überprüfen Sie die Intensitäten pro Zyklus. Für jeden gescannten Bildstreifen wird nur ein Miniaturbild dargestellt. Die anderen Bilder werden in der Benutzeroberfläche der Software nicht angezeigt.

Bericht zur ersten Base

Wenn Sie während der Einrichtung des Laufs die Option **Confirm First Base** (Erste Base bestätigen) aktiviert haben, wird das Bestätigungsdialogfeld für die erste Base automatisch nach Abschluss des zweiten Zyklus angezeigt. Der Lauf wird an diesem Punkt angehalten.

1 Überprüfen Sie den Bericht zur ersten Base im Bestätigungsdialogfeld.

2 Wenn die Ergebnisse zufriedenstellend sind, wählen Sie **Continue** (Fortfahren).

Sequenzierungsanalyse-Viewer

Die Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software zeigt die Sequenzierungskennzahlen, die während des Sequenzierungslaufs generiert werden. Die Kennzahlen werden in Form von Schaubildern, Diagrammen und Tabellen dargestellt. Der Sequenzierungsanalyse-Viewer wird automatisch geöffnet, wenn die Laufkennzahlen verfügbar sind.

Wählen Sie zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Laufs **Refresh** (Aktualisieren), um aktualisierte Kennzahlen zu erhalten.

Weitere Informationen finden Sie im *Sequenzierungsanalyse-Viewer-Benutzerhandbuch (Teile-Nr. 15020619)*.

Verfahren nach einem Lauf

Wenn der Lauf abgeschlossen ist, entladen und wiegen Sie die Reagenzien und führen Sie anschließend einen Gerätewaschlauf durch. Weitere Informationen finden Sie unter *Verfahren nach einem Lauf* auf Seite 35.

Verfahren nach einem Lauf

Kapitel 3

Einleitung 36
Entladen und Wiegen von Reagenzien 37
Durchführen eines Wartungswaschlaufs 38
Durchführen eines Wasserwaschlaufs 41
Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks durchführen 43
Gerät in den Leerlauf versetzen 44
Ausschalten des Geräts 45

Einleitung

Zu den Verfahren nach einem Lauf gehören das Entfernen und das Wiegen der Reagenzien sowie ein Gerätewaschlauf. Ein Wasserwaschlauf ist nach jedem Lauf erforderlich, wobei wahlweise ein Wartungswaschlauf durchgeführt werden kann. Illumina empfiehlt einen Wartungswaschlauf.

Durch regelmäßige Gerätewaschläufe wird die kontinuierliche Leistungsfähigkeit des Geräts wie folgt sichergestellt:

- Ggf. vorhandene Reagenzien- und Probenreste werden aus den Fluidikschläuchen und Sippern gespült.
- Eine Ansammlung und Kristallisation von Salz in den Fluidikschläuchen und Sippern wird verhindert.
- Eine Kreuzkontaminierung aus dem vorherigen Lauf wird verhindert.

HINWEIS

Am Ende jedes Laufs wird ein Wasserwaschlauf durchgeführt, um das System zu waschen und die Fluidik zu überprüfen. Bei der Einrichtung eines Laufs prüft die Software, ob innerhalb der letzten 24 Stunden ein Wasserwaschlauf oder ein Wartungswaschlauf durchgeführt wurde. Ein Wartungswaschlauf ist alle zehn Tage erforderlich. Zehn Tage nach dem letzten Wartungswaschlauf werden Sie aufgefordert, einen Wartungswaschlauf durchzuführen.

Entladen und Wiegen von Reagenzien

HINWEIS
Gehen Sie mit Reagenzien wie mit chemischen Abfällen um. Reagenzien müssen gemäß den Sicherheitsstandards Ihres Landes entsorgt werden.

1 Öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer.

2 Heben Sie die Sipper für den entsprechenden SBS-Rack bzw. Paired-End-Rack wie folgt an:
   a Ziehen Sie den Sippergriff auswärts.
   b Heben Sie den Sippergriff an und ziehen Sie ihn gleichzeitig auswärts.
   c Schieben Sie den Sippergriff in die Aussparung am oberen Ende der Schiene. Vergewissern Sie sich, dass der Sippergriff fest in der Aussparung sitzt.

3 Schieben Sie den Reagenzien-Rack mithilfe des Rack-Griffs aus der Reagenzienkammer.

4 Nehmen Sie die Flaschen aus dem Reagenzien-Rack und dokumentieren Sie das Gewicht auf dem Laborkontrollformular.
   Sie können ein interaktives Laborkontrollformular von der HiSeq 4000-Supportseite der Illumina-Website herunterladen.

WARNUNG
Die Reagenzien enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. Es kann daher durch Inhalation, orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder Kontakt mit den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Behälter und nicht verwendeter Inhalt müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden. Weitere Informationen finden Sie im SDS für dieses Kit unter support.illumina.com/sds.html.

Durchführen eines Wartungswaschlaufs

Ein Wartungswaschlauf muss alle zehn Tage und wahlweise nach einem Sequenzierungslauf durchgeführt werden. Illumina empfiehlt einen Wartungswaschlauf nach jedem Sequenzierungslauf.

Der Bildschirm „Load Gasket“ (Dichtung einsetzen) öffnet mit einem Wartungswaschlauf alle zehn Tage. Ersetzen Sie vor dem Waschlauf die Dichtungen im vorderen und hinteren Manifold.

Ein Wartungswaschlauf dauert ca. 2,5 Stunden. Dabei wird das System mit einer vorbereiteten Lösung aus Tween 20 und ProClin 300 gespült.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

- Ethanol-Tupfer
- Acht Flaschen, 250 ml (Corning, Katalognr. 430776)
- Zehn Röhrchen, 15 ml (Corning, Katalognr. 430052)
- Wasser in Laborqualität
- ProClin 300 (Sigma-Aldrich, Katalognr. 48912-U)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Katalognr. P7949)

Vorbereiten der Lösung für den Wartungswaschlauf

Bereiten Sie fünf Liter Wartungswaschlauflösung für die Verwendung mit einem Gerät vor. Die Lösung kann bis zu 30 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und während dieser Zeit bis zu dreimal verwendet werden.

1. Bereiten Sie 250 ml von 10 % Tween 20 vor, indem Sie die folgenden Volumina mischen (fügen Sie zuerst das Wasser hinzu):
   - Wasser in Laborqualität (225 ml)
   - Tween 20 (25 ml)
2. Platzieren Sie einen Rührstab in einer leeren Ballonflasche mit einem Fassungsvermögen von mindestens sechs Litern.
3. Kombinieren Sie die folgenden Volumina in der Ballonflasche (fügen Sie zuerst das Wasser hinzu):
   - Wasser in Laborqualität (750 ml)
   - 10 % Tween 20 (250 ml)
   - ProClin 300 (1,5 ml)

   Diese Volumina ergeben eine Lösung aus ca. 2,5 % Tween 20 und 0,15 % ProClin 300.
4. Stellen Sie die Ballonflasche auf eine Rührplatte und rühren Sie so lange, bis die Mischung gründlich gemischt ist.
5. Fügen Sie der Lösung vier Liter Wasser in Laborqualität zu. Diese Volumina ergeben eine Waschlösung aus ca. 0,5 % Tween 20 und 0,03 % ProClin 300.
6. Rühren Sie weiter, bis die Lösung gründlich gemischt ist.
7. Legen Sie sie bei Raumtemperatur in einem geschlossen Behälter zur Seite, bis Sie bereit sind, die Reagenzienflaschen und -röhrchen mit der Waschlösung zu füllen bzw. nachzufüllen.

Tween 20- und ProClin 300-Waschlauf

1. Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Wash** | **Maintenance** (Waschlauf | Wartung).
2. Wenn Sie die Wartungswaschlauflösung eines vorherigen Laufs aufbewahrt haben, füllen Sie die aufbewahrte Waschlösung auf und invertieren Sie sie zum Mischen. Bereiten Sie andernfalls die Waschlaufkomponenten wie folgt mit frischer Waschlösung vor:
   a. Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit 250 ml Wartungswaschlauflösung.
   b. Füllen Sie zehn PE-Röhrchen mit 12 ml Wartungswaschlauflösung.
   c. Weisen Sie jeder Flasche und jedem Röhrchen eine Position im Reagenzien-Rack zu und behalten Sie diese für die nachfolgenden Waschläufe bei. Anderenfalls könnte die Waschlösung mit Reagenzien aus den Sippern kontaminiert werden.
3. Laden Sie die Flaschen und Röhrchen in die zugewiesenen Positionen des Reagenzien-Racks im Gerät.
4. Wählen Sie **Next** (Weiter).
5. Entfernen Sie die Fließzelle vom Fließzellentisch und legen Sie sie beiseite, bis Sie dieselbe Fließzelle erneut laden, bevor Sie den Waschlauf starten.
6. Ziehen Sie ein neues Paar Schutzhandschuhe an und drücken Sie leicht auf eine Seite der Dichtung, bis die andere Seite passt. Verwenden Sie eine Pinzette, um die Dichtung zu fassen und zu entfernen. Entfernen Sie die hintere Dichtung auf dieselbe Weise.

   Abbildung 24 Entfernen der gebrauchten Manifold-Dichtungen

7. Setzen Sie je eine neue Dichtung in das vordere und das hintere Manifold ein.
8. Setzen Sie die Fließzelle wieder ein.
9. Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vacuum Engaged** (Vakuum aktiviert) auf dem Bildschirm für das Laden der Wasch-Fließzelle aktiviert ist.
10. Wählen Sie **Next** (Weiter).
11. Führen Sie eine Fluidikprüfung durch:
    a. Wählen Sie Lösung 2 aus der Dropdown-Liste. Akzeptieren Sie die Standardwerte für die Pumpe.
    b. Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
    c. Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds. Zusätzliche Luftblasen sind bei Tween 20- und ProClin 300-Waschläufen normal und haben keinen Einfluss auf das abgegebene Volumen.

12 Entfernen Sie die acht Abfallröhrchen der entsprechenden Fließzelle vom Abfallbehälter. Entfernen Sie nicht die acht Röhrchen der gegenüberliegenden Fließzelle oder die Röhrchen der Kondensatpumpe.

13 Bündeln Sie die acht Abfallröhrchen mit Parafilm, sodass sie nebeneinanderliegen. Platzieren Sie die gebündelten Enden der Abfallröhrchen in einer 250-ml-Flasche.

14 Wählen Sie **Next** (Weiter), um den Wasserwaschlauf zu starten.

15 Wählen Sie nach Abschluss des Waschlaufs **Return to Start** (Zurück zum Anfang).

16 Messen Sie das abgegebene Volumen.

HINWEIS

Alle Flaschen und Röhrchen werden vollgefüllt, um sicherzugehen, dass die Sipper gespült werden. Das abgegebene Volumen für jede Position variiert jedoch, sodass nach Abschluss des Waschlaufs die Flaschen und Röhrchen unterschiedliche Volumina enthalten.

Positionen	Abgegebenes Volumen
Acht SBS-Positionen	82 ml
10 Paired-End-Positionen	76 ml
Alle Positionen	19,75 ml pro Lane

17 Entfernen Sie die Umwicklung von den Abfallröhrchen und setzen Sie sie wieder in den Abfallbehälter ein.

Durchführen eines Wasserwaschlaufs

Nach jedem Sequenzierungslauf ist ein Wasserwaschlauf erforderlich, wobei die Option besteht, stattdessen einen Wartungswaschlauf durchzuführen. Illumina empfiehlt, nach jedem Lauf einen Wartungswaschlauf durchzuführen.

Wenn das Gerät seit mindestens einem Tag nicht verwendet wurde, führen Sie einen Wasserwaschlauf durch, bevor Sie einen neuen Sequenzierungslauf starten.

Von Illumina bereitgestellte Verbrauchsmaterialien

- Wasser in Laborqualität

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien

- Acht Flaschen, 250 ml (Corning, Katalognr. 430776)
- Zehn Röhrchen, 15 ml (Corning, Katalognr. 430052)
- Wasser in Laborqualität

Verfahren

1. Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Wash** | **Water** (Waschen | Wasser) aus.
2. Wählen Sie **Yes** (Ja), um die Paired-End-Reagenzienpositionen zu waschen. Wählen Sie ansonsten **No** (Nein), um nur die SBS-Reagenzienpositionen zu waschen. Wählen Sie **Next** (Weiter), um fortzufahren.
3. Laden Sie Wasser in Laborqualität wie folgt in das Gerät:
   a. Füllen Sie acht SBS-Flaschen mit 250 ml Wasser in Laborqualität.
   b. Füllen Sie zehn PE-Röhrchen mit 12 ml Wasser in Laborqualität.
4. Stellen Sie sicher, dass eine gebrauchte Fließzelle geladen ist. Setzen Sie ggf. eine gebrauchte Fließzelle ein. Wählen Sie **Next** (Weiter).
5. Führen Sie eine Fluidikprüfung durch:
   a. Wählen Sie Lösung 2 aus der Dropdown-Liste. Akzeptieren Sie die Standardwerte für die Pumpe.
   b. Wählen Sie **Pump** (Pumpe).
   c. Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
6. Entfernen Sie die Abfallschläuche der entsprechenden Fließzelle vom Abfallbehälter. Entfernen Sie nicht die Abfallschläuche der gegenüberliegenden Fließzelle oder die Schläuche der Kondensatpumpe.
7. Bündeln Sie die Abfallschläuche mit Parafilm, sodass die Enden nebeneinanderliegen. Platzieren Sie die gebündelten Enden der Abfallschläuche in einer 250-ml-Flasche.
8. Wählen Sie **Next** (Weiter), um den Wasserwaschlauf zu starten.

Positionen	Ungefähre Laufzeit
Acht SBS-Positionen	20 Minuten
Acht SBS-Positionen und zehn Paired-End-Positionen	60 Minuten

9 Messen Sie nach Abschluss des Waschlaufs die abgegebenen Volumina und dokumentieren Sie sie auf dem Laborkontrollformular.

Positionen	Abgegebenes Volumen insgesamt	Abgegebenes Volumen pro Lane
Acht SBS-Positionen	32 ml	4 ml
Acht SBS-Positionen und zehn Paired-End-Positionen	72 ml	9 ml

10 Entfernen Sie die Umwicklung von den Abfallschläuchen und setzen Sie die Schläuche wieder in die Abfallflasche ein.

Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks durchführen

Um auf dem Gerätecomputer Speicherplatz für einen nachfolgenden Lauf freizugeben, empfiehlt Illumina, eine Schnellformatierung des Ausgabelaufwerks (O:\) durchzuführen, nachdem ein Lauf abgeschlossen ist. Eine Schnellformatierung löscht das Laufwerk O:\, ohne wichtige System- oder Gerätewartungsdateien zu entfernen.

HINWEIS

Gerätewartungsprotokolle werden auf dem Laufwerk C:\ gespeichert. Daher kann gefahrlos eine Schnellformatierung von Laufwerk O:\ vorgenommen werden, während ein Gerätewaschlauf durchgeführt wird.

1. Öffnen Sie in Windows „Computer“, um eine Liste der Computerlaufwerke anzuzeigen.
2. Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Laufwerk O:\ und wählen Sie **Formatieren**.
3. Aktivieren Sie im Dialogfeld „Formatieren“ das Kontrollkästchen **Schnellformatierung**.
4. Wählen Sie **Start**.

Gerät in den Leerlauf versetzen

Gehen Sie wie nachfolgend beschrieben vor, wenn das Gerät bis zu zehn Tage im Leerlaufmodus bleiben soll. Falls das Gerät länger als zehn Tage nicht verwendet werden soll, lesen Sie den Abschnitt *Ausschalten des Geräts* auf Seite 45.

1. Führen Sie einen vollständigen Wartungswaschlauf durch, um das System gründlich zu spülen. Weitere Informationen finden Sie unter *Durchführen eines Wartungswaschlaufs* auf Seite 38.
2. Lassen Sie die Fließzelle auf dem Fließzellentisch, wobei sich der Fließzellenregler in Position 2 befinden muss. Die Manifolds bleiben in der angehobenen Position.
3. Geben Sie 10 ml Wasser in Laborqualität in jede Reagenzienposition in den Reagenzien-Racks. Senken Sie dann die Sipper in das Wasser ab.
4. Schalten Sie das Gerät nicht aus.
5. Bevor Sie das Gerät erneut verwenden, führen Sie einen Wasserwaschlauf durch. Weitere Informationen finden Sie unter *Durchführen eines Wasserwaschlaufs* auf Seite 41.

Ausschalten des Geräts

Schalten Sie das Gerät nur aus, wenn es innerhalb der nächsten zehn Tage oder länger nicht benutzt werden soll. Wenn Sie das Gerät innerhalb der nächsten zehn Tage verwenden möchten, lesen Sie den Abschnitt *Gerät in den Leerlauf versetzen* auf Seite 44.

Gehen Sie wie folgt vor, um die Fluidik sicher vorzubereiten und das System auszuschalten.

1. Führen Sie einen Wartungswaschlauf durch, um das System zu spülen. Weitere Informationen finden Sie unter *Durchführen eines Wartungswaschlaufs* auf Seite 38.
2. Entfernen Sie die Fließzelle vom Fließzellentisch.
3. Wischen Sie die Oberfläche des Fließzellenhalters vorsichtig mit einem Alkoholtupfer oder einem fusselfreien, mit Ethanol oder Isopropanol befeuchteten Tuch ab, bis er sauber ist.

   ACHTUNG!
   Es darf kein Alkohol in die Vakuumöffnungen oder auf die Umgebung der Manifolds gelangen. Reinigen Sie den Tisch ggf. mit einem fusselfreien Tuch.
4. Geben Sie 10 ml Wasser in Laborqualität in jede Reagenzienposition in den Reagenzien-Racks. Senken Sie dann die Sipper in das Wasser ab.
5. Schalten Sie das Gerät aus.
6. Um das Gerät wieder zu starten, geben Sie Wasser in alle Reagenzienpositionen, schalten Sie das Gerät ein und führen Sie einen Wasserwaschlauf durch. Weitere Informationen finden Sie unter *Durchführen eines Wasserwaschlaufs* auf Seite 41.

Echtzeitanalyse

Einleitung 48
Überblick über RTA v2 49
Echtzeitanalyse-Workflow 51
Sequenzierung von Ausgabedateien 55
Plattennummerierung 56

Einleitung

Die Echtzeitanalyse-Software führt während des Sequenzierungslaufs auf dem Gerät eine Bildanalyse und ein Base-Calling durch, wodurch wertvolle Zeit bei der anschließenden Datenanalyse eingespart werden kann. Das HiSeq 4000-System verwendet eine neue Implementierung der Echtzeitanalyse (RTA)-Software namens RTA v2, die die folgenden wichtigen Unterschiede bezüglich der Architektur und der Funktionen aufweist:

- Die Konfigurationsdateien, das Format der Ausgabedateien und der Verarbeitungs-Workflow sind gegenüber Vorgängerversionen der Software unterschiedlich.
- Die Konfigurationsdatei-Einstellungen von Vorgängerversionen sind nicht mit RTA v2 kompatibel.
- Wenn RTA v2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert.
- Die Demultiplexierungsleistung wird nicht berechnet. Daher wird die Registerkarte „Index“ im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) nicht ausgefüllt.

Überblick über RTA v2

RTA v2 wird auf dem Computer des Geräts ausgeführt und extrahiert Intensitäten aus Bildern, führt das Base-Calling durch und weist dem Base-Call einen Qualitäts-Score zu.

Im Gegensatz zu früheren Versionen der Echtzeitanalyse-Software kommunizieren RTA v2 und die Steuerungssoftware über ein HTTP-Webinterface und gemeinsame Speicherbereiche.

Wenn RTA v2 beendet wird, nimmt RTA v2 die Verarbeitung nicht wieder auf und die Laufdaten werden nicht gespeichert. Daher kann ein Lauf nicht fortgesetzt werden, nachdem er gestoppt wurde. RTA v2 nimmt die Verarbeitung nur dann automatisch wieder auf, wenn der Lauf unterbrochen wurde.

Wenn die Netzwerkverbindung unterbrochen wird, fährt RTA v2 mit der Verarbeitung fort und speichert die Daten lokal. Nach Wiederherstellung der Verbindung wird die Datenübertragung automatisch fortgesetzt.

RTA v2-Eingabe

RTA v2 benötigt die folgenden Eingabedateien:

- Die im lokalen Speicher des Systems gespeicherten Plattenbilder.
- RunInfo.xml, die von der Steuerungssoftware zu Beginn des Laufs automatisch generiert wird. RTA v2 liest aus dieser Datei den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen und die Angabe, ob ein Read indiziert ist, sowie die Anzahl der Platten auf der Fließzelle.
- RTA.exe.config, eine Softwarekonfigurationsdatei im XML-Format.

RTA v2 erhält Befehle von der Steuerungssoftware, die über den Speicherort der Datei RunInfo.xml und darüber informieren, ob ein optionaler Ausgabeordner angegeben wurde oder nicht.

RTA v2-Ausgabe

Bilder von jedem Kanal werden gespeichert und als Platten an RTA v2 übergeben. RTA v2 generiert von diesen Bildern primäre Ausgabedateien, die mehrere hinsichtlich ihrer Qualität ausgewertete Base-Call-Dateien und Filterdateien umfassen. Andere Dateien unterstützen die Generierung primärer Ausgabedateien.

- **Base-Call-Dateien**: Für jede analysierte Platte wird eine komprimierte Base-Call-Datei (*.bcl) pro Zyklus generiert. Die Base-Call-Datei enthält den Base-Call und den entsprechenden Qualitäts-Score.
- **Filterdateien**: Jede Platte liefert Filterinformationen, die pro Platte über den gesamten Lauf in einer Filterdatei (*.filter) gespeichert werden. Die Filterdatei gibt an, ob Cluster die Filter passiert haben.
- **Clusterpositionsdateien**: Die Clusterpositionsdatei (s.locs) enthält die X- und Y-Koordinaten jedes Clusters auf der Fließzelle.

Die primären Ausgabedateien werden für die anschließende Datenanalyse verwendet. Mit der Konvertierungssoftware bcl2fastq können Sie die Demultiplexierung und FASTQ-Konvertierung durchführen. Verwenden Sie bcl2fastq v2.16 oder höher zum Konvertieren von HiSeq 4000-Daten. Die aktuelle Softwareversion und Informationen zum Download finden Sie auf der HiSeq 4000-Supportseite der Illumina-Website.

RTA v2 liefert Echtzeitkennzahlen zur Laufqualität, die in InterOp-Dateien gespeichert werden. InterOp-Dateien sind Binärdateien mit Kennzahlen zu Platten, Zyklen und zur Read-Ebene. Sie werden benötigt, um Kennzahlen im Sequenzierungsanalyse-Viewer

ansehen zu können. Verwenden Sie zur Anzeige der von RTA v2 generierten Kennzahlen SAV v1.8.46 oder höher.

Weitere Informationen finden Sie unter *Sequenzierung von Ausgabedateien* auf Seite 55.

RTA v2-Fehlerbehandlung

RTA v2 generiert Protokolldateien im Ordner „RTALogs“. Wenn ein Fehler auftritt, wird dieser in einer separaten CSV-Datei protokolliert. Nachdem die Verarbeitung abgeschlossen ist, werden alle Protokolldateien an das endgültige Ausgabeziel übertragen.

Folgende Protokolldateien werden beim Auftreten von Fehlern erstellt:

- *GlobalLog*.tsv enthält eine Zusammenfassung wichtiger Lauf-Ereignisse.
- *LaneNLog*.tsv protokolliert die Verarbeitungsereignisse pro Lane.
- *Error*.tsv protokolliert während des Laufs aufgetretene Fehler.
- *WarningLog*.tsv führt während des Laufs aufgetretene Warnungen auf.

Datenübertragung

Während des Laufs fordert RTA v2 eine Datenübertragung von RunCopyService an, der Software, die die Übertragung auf den angegebenen Ausgabeordner steuert. Wenn BaseSpace verwendet wird, sorgt der BaseSpace Broker für die Übertragung von Daten nach BaseSpace. Wenn die Netzwerkverbindung unterbrochen wird, fährt RTA v2 mit der Verarbeitung fort und speichert die Daten lokal. Die Datenübertragung wird fortgesetzt, wenn die Verbindung wiederhergestellt wurde.

HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass Ihre Netzwerkverbindung die Mindestanforderungen zum Senden der Laufdaten an BaseSpace erfüllt. Weitere Informationen finden Sie im Handbuch zur Laboreinrichtung und Standortvorbereitung für Ihre HiSeq-Konfiguration. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Weitere Ressourcen* auf Seite 13.

Nach Abschluss des Vorgangs erstellt RTA v2 eine Markerdatei namens „RTAComplete.txt“. Die Datenübertragung wird abgeschlossen, sobald diese Datei generiert wurde.

Echtzeitanalyse-Workflow

Der Workflow der Echtzeitanalyse besteht aus den folgenden Schritten:

- **Matrizenbildung**: Definiert die Clusterpositionen.
- **Registrierung und Intensitätsextraktion**: Zeichnet die Position der einzelnen Cluster auf der strukturierten Fließzelle auf und ermittelt einen Intensitätswert für jeden Cluster.
- **Farbmatrixkorrektur**: Korrigiert Crosstalk zwischen Kanälen.
- **Korrektur der empirischen Phasierung**: Korrigiert die Auswirkungen der Phasierung und Vorphasierung.
- **Base-Calling**: Legt für jeden Cluster einen Base-Call fest.
- **Qualitätsbewertung**: Weist jedem Base-Call einen Qualitäts-Score zu.

Matrizenbildung

Der erste Schritt im Workflow ist die Matrizenbildung. Hierbei werden die einzelnen Clusterpositionen in einer Platte anhand von X- und Y-Koordinaten definiert. Die Matrize wird bei der Registrierung und Intensitätsextraktion im nachfolgenden Schritt zu Referenzzwecken verwendet.

Aufgrund des Arrays auf der strukturierten Fließzelle sind die Clusterpositionen entsprechend der Anzahl der Reihen, der Anzahl der Spalten und des Abstands zwischen den Nanowells auf der Fließzelle vordefiniert. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Strukturierte Fließzelle* auf Seite 5.

Die Clusterpositionen des gesamten Laufs werden in einer Clusterpositionsdatei (s.locs) gespeichert. Weitere Informationen finden Sie unter *Sequenzierung von Ausgabedateien* auf Seite 55.

Registrierung und Intensitätsextraktion

Die Registrierung und die Intensitätsextraktion werden durchgeführt, nachdem die Matrize mit den Clusterpositionen erstellt wurde.

- Bei der Registrierung werden die Clusterpositionen in der Matrize an die Positionen auf dem Bild in jedem der vier Farbkanäle übertragen.
- Die Intensitätsextraktion ermittelt für ein bestimmtes Bild einen Intensitätswert für jeden Cluster in der Matrize.

Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden für diese Platte in diesem Zyklus keine Base-Calls erzeugt. Sehen Sie sich im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) die Miniaturbilder an und überprüfen Sie, ob die Registrierung bei einzelnen Bildern fehlgeschlagen ist. Weitere Informationen finden Sie unter *Sequenzierung von Ausgabedateien* auf Seite 55.

Farbmatrixkorrektur

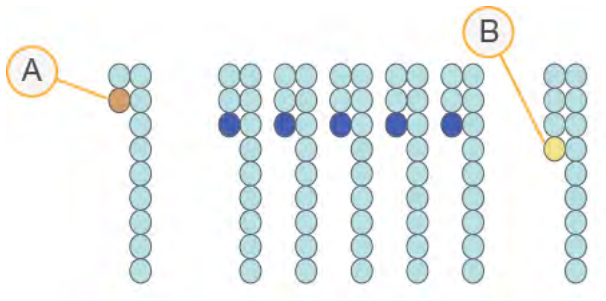
Nach der Registrierung und Intensitätsextraktion korrigiert RTA v2 den Crosstalk zwischen Kanälen. Crosstalk tritt z. B. auf, wenn ein Cluster Intensität in Kanal C und auch etwas Intensität in Kanal A zeigt. RTA v2 korrigiert mithilfe einer 4-x-4-Farbmatrix die Intensitäten, sodass sie nur einen geringen oder keinen Crosstalk aufweisen, und gleicht Unterschiede in der Gesamtintensität zwischen den Farbkanälen aus.

Korrektur der empirischen Phasierung

Während der Sequenzierungsreaktion erweitert sich jeder DNA-Strang in einem Cluster um eine Base pro Zyklus. Die Phasierung und Vorphasierung finden statt, wenn eine Phasenverschiebung eines Strangs mit dem aktuellen Inkorporationszyklus eintritt.

- Eine Phasierung tritt ein, wenn eine Base zurückfällt.
- Eine Vorphasierung tritt ein, wenn eine Base vorauseilt.

Abbildung 25 Phasierung und Vorphasierung



A Read mit einer phasierenden Base
B Read mit einer vorphasierenden Base

RTA v2 verwendet den Algorithmus zur Korrektur der empirischen Phasierung, um die Auswirkungen der Phasierung und der Vorphasierung zu korrigieren. Bei diesem Algorithmus wird während jedes Zyklus des Laufs die Datenqualität maximiert.

Die Ergebnisse der Phasierung und Vorphasierung werden in der Datei EmpiricalPhasing_[Lane]_[Read]_[Platte].txt aufgezeichnet, die sich im Ordner Data\Intensities\BaseCalls\Phasing befindet.

Base-Calling

Nachdem die Roh-Intensitäten farbkorrigiert und die Phasierungs- und Vorphasierungsdaten korrigiert wurden, ist der Farbkanal mit der hellsten Intensität der Base-Call für diesen Cluster in diesem Zyklus. Das Base-Calling beginnt auf einem HiSeq 4000-System, das RTA v2 verwendet, nach Zyklus 3.

Beim Base-Calling wird eine Base (A, C, G, oder T) für jeden Cluster einer bestimmten Platte eines bestimmten Zyklus festgelegt. Base-Calls werden in Base-Call-Dateien (*.bcl) gespeichert. Base-Call-Dateien sind Binärdateien mit 1 Byte pro Call und Qualitäts-Score. Jede Base-Call-Datei enthält den Base-Call und den entsprechenden Qualitäts-Score. Um einen Base-Call durchzuführen, müssen die Cluster zunächst den Reinheitsfilter passieren. Cluster, die den Filter nicht passieren oder nicht aufgerufen werden können, weil sie außerhalb des Bildes sind oder die Bildregistrierung fehlgeschlagen ist, werden als No-Calls beschriftet. No-Calls werden mit (N) dargestellt.

Cluster nach Filterung

Während der ersten 25 Zyklen von Read 1 entfernt der Reinheitsfilter Cluster niedriger Qualität aus den Analysenergebnissen. Cluster passieren den Filter, wenn nicht mehr als ein Base-Call einen Reinheitswert unter 0,6 in den ersten 25 Zyklen aufweist. Die Reinheit ist definiert als das Verhältnis der hellsten Basenintensität dividiert durch die Summe der hellsten und der zweithellsten Basenintensität. Der Prozentsatz der Cluster, die den Filter passieren (Cluster nach Filterung), wird in den Analyseberichten als %PF dargestellt.

Die strukturierte Fließzelle des HiSeq 4000-Systems generiert verglichen mit anderen HiSeq-Modellen einen niedrigeren Prozentsatz an Clustern nach Filterung. Der Unterschied beruht auf den Eigenschaften eines geordneten Arrays von Clustern auf einer strukturierten Fließzelle im Vergleich zum zufälligen Array von Clustern einer nicht strukturierten Fließzelle.

- **Zufällige Cluster in einer nicht strukturierten Fließzelle**: Die Cluster werden während der Matrizenbildung in einem zufälligen Array gebildet und platziert. Cluster mit niedriger Qualität werden während der Matrizenbildung aus der Roh-Cluster-Anzahl entfernt, wodurch sich ein relativ hoher Prozentsatz von Clustern nach Filterung ergibt.
- **Geordnetes Array von Clustern auf einer strukturierten Fließzelle**: Cluster werden in einem vordefinierten Array aus Nanowells gebildet. Leere Wells ohne Cluster sowie polyklonale Wells, bei denen mehr als eine Sequenz vorhanden ist, sind in der Roh-Cluster-Anzahl enthalten, passieren aber nicht den Filter. Daher liefert ein geordnetes Array auf einer strukturierten Fließzelle einen relativ niedrigen Prozentsatz von Clustern nach Filterung.

Abbildung 26 Leere und polyklonale Wells (in der Roh-Cluster-Anzahl enthalten)

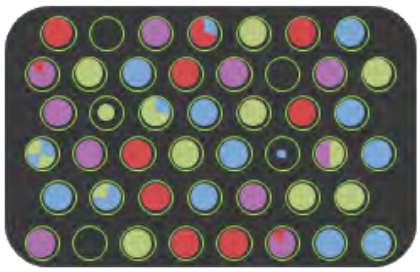
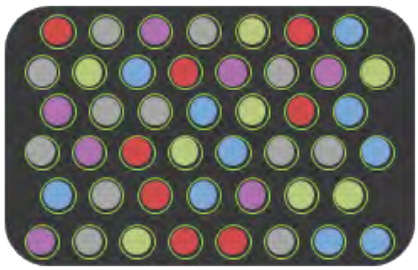


Abbildung 27 Wells mit Clustern, die nicht den Filter passieren (grau dargestellt)



Qualitätsbewertung

Ein Qualitäts-Score oder Q-Score ist eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Base-Calls. Je höher der Q-Score ist, desto höher ist die Qualität des Base-Calls und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser korrekt ist.

Der Q-Score ist eine kompakte Möglichkeit, kleine Fehlerwahrscheinlichkeiten zu kommunizieren. Qualitäts-Scores werden als Q(X) dargestellt, wobei X der Score-Wert ist. Die folgende Tabelle zeigt die Beziehung zwischen dem Qualitäts-Score und der Fehlerwahrscheinlichkeit.

Q-Score Q(X)	Fehlerwahrscheinlichkeit
Q40	0,0001 (1 in 10.000)
Q30	0,001 (1 in 1.000)
Q20	0,01 (1 in 100)
Q10	0,1 (1 in 10)

HINWEIS
Die Qualitätsbewertung basiert auf einer geänderten Version des Phred-Algorithmus. Weitere Informationen finden Sie unter en.wikipedia.org/wiki/Phred_quality_score.

Die Qualitätsbewertung berechnet für jeden Base-Call mehrere Fehlerwahrscheinlichkeiten und ermittelt anhand der Prognosewerte den Q-Score aus einer Qualitätstabelle. Qualitätstabellen werden erstellt, um optimale Qualitätsprognosen für Läufe zu liefern, die auf spezifisch konfigurierten Sequenzierplattformen mit bestimmten Chemie-Versionen durchgeführt werden.

Nachdem der Q-Score ermittelt wurde, werden die Ergebnisse in Base-Call-Dateien (*.bcl) gespeichert. Weitere Informationen finden Sie unter *Sequenzierung von Ausgabedateien* auf Seite 55.

Q-Score-Gruppierung

RTA v2 gruppiert die Qualitäts-Scores in bestimmte Bereiche und weist jedem Bereich einen Wert zu. Die Q-Score-Gruppierung reduziert den Speicherplatzbedarf erheblich, ohne die Genauigkeit und Leistung von nachgeschalteten Anwendungen zu beeinträchtigen.

Die Q-Score-Gruppierung trägt zur Effizienz der Analyseverfahren und Datenübertragungsanforderungen bei, die mit dem hohen Durchsatz des HiSeq 4000-Systems einhergehen. Die resultierende *.bcl-Datei ist kleiner, da die Komprimierungsalgorithmen die Datei besser komprimieren können. Es werden weniger Daten auf den Gerätecomputer geschrieben und auf einen Speicherort im Netzwerk übertragen, wodurch das Kopieren der Dateien schneller erfolgt.

Sequenzierung von Ausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Base-Call-Dateien	Die Analyseergebnisse der einzelnen Platten werden in Base-Call-Dateien gespeichert. Sie enthalten den Base-Call und den kodierten Qualitäts-Score. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien für jede Platte werden pro Zyklus in den jeweiligen Ordnern gespeichert. s_[Lane]_[Platte].bcl.gz, wobei „Lane“ der Platzhalter für die einstellige Nummer der Lane und „Platte“ der Platzhalter für die vierstellige Plattennummer ist. Die Base-Call-Dateien werden mit dem gzip-Tool komprimiert.
Clusterpositionsdateien	Die Clusterpositionsdateien für die einzelnen Platten enthalten die X- und Y-Koordinaten jedes Clusters. Clusterpositionsdateien werden bei der Matrizenbildung generiert. Data\Intensities: Eine Datei für den gesamten Lauf wird im Ordner „Intensities“ gespeichert. s.locs
Filterdateien	Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Filterdateien werden bei Zyklus 26 generiert und verwenden 25 Datenzyklen. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien werden pro Lane und Platte in einem entsprechenden Ordner gespeichert. s_[Lane]_[Platte].filter
InterOp-Dateien	Binäre Berichtsdateien, die im Sequenzierungsanalyse-Viewer verwendet werden. InterOp-Dateien werden während des Laufs aktualisiert. InterOp-Ordner
RTA-Konfigurationsdatei	Die RTA-Konfigurationsdatei wird zu Beginn des Laufs generiert. Sie enthält die Einstellungen für den Lauf. [Stammordner] RTAConfiguration.xml
Laufinformationsdatei	Enthält den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen in jedem Read, die Angabe, ob der Read indiziert ist, sowie die Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle. Die Laufinformationsdatei wird am Anfang des Laufs generiert. [Stammordner] RunInfo.xml
Miniaturbilddateien	Während der Bildgebung wird bei jedem Zyklus ein Miniaturbild für jeden Kanal und jede Platte in den einzelnen Bildstreifen erzeugt. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: Für jede Lane wird ein Ordner und für jeden Zyklus ein entsprechender Unterordner angelegt. s_[Lane]_[Platte]_[Kanal].jpg: „Platte“ ist der Platzhalter für die vierstellige Zahl, die die Oberfläche, die Bildstreifen und die Platte angibt. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Plattennummerierung* auf Seite 56.

Plattennummerierung

Die strukturierte Fließzelle des HiSeq 4000-Systems wird für jeden Zyklus in 112 Platten auf jeder Lane oben und unten aufgenommen. Jede Lane hat zwei Bildstreifen mit je 28 Platten. Die Platten werden entsprechend ihrer Position nummeriert.

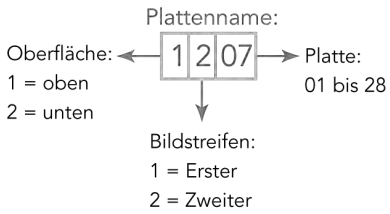
Der Plattenname ist eine vierstellige Zahl, die die Position der Fließzelle darstellt.

- Die erste Ziffer steht für die Oberfläche:
  - 1 steht für oben
  - 2 steht für unten
- Die zweite Ziffer steht für den Bildstreifen:
  - 1 steht für den ersten Bildstreifen
  - 2 steht für den zweiten Bildstreifen

HINWEIS
Ein Bildstreifen ist eine Plattenreihe innerhalb einer Lane der Fließzelle.

- Die letzten zwei Ziffern stehen für die Platten 01 bis 28. Die Plattennummerierung beginnt bei 01 am Ausgabeende der Fließzelle bis 28 am Eingabeende.

Abbildung 28 Plattennummerierung



In diesem Beispiel handelt es sich um eine Platte aus der oberen Oberfläche der Fließzelle, den zweiten Bildstreifen und die siebte Platte.

Fehlerbehebung

Kapitel 5

Einleitung 58
Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration 59
Durchführen einer Fluidikprüfung 60
Anhalten oder Abbrechen eines Laufs 61
Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B 63
Mögliche Primer-Rehybridisierung für Read 1 64

Einleitung

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, was Sie bei Problemen, die während der Durchführung eines Sequenzierungslaufs auftreten können, tun können. Darüber hinaus enthält er Anweisungen zur Durchführung einer Fluidikprüfung im Begrüßungsbildschirm.

Mögliche Probleme bei der Laufkonfiguration

Problem	Mögliche Ursache	Aktion
Die Software wurde nicht initialisiert.	Die Software konnte interne Hardwaregeräte nicht initialisieren.	Schließen Sie die Fehlermeldung und starten Sie anschließend die Gerätesoftware neu. Falls das Problem weiterhin besteht, starten Sie den Gerätecomputer neu. Wenn Sie den Computer neu starten möchten, schalten Sie das Gerät zuerst aus, um sicherzustellen, dass das „DoNotEject“-Laufwerk korrekt erkannt wird. Falls das Problem nach dem Neustart des Gerätecomputers weiterhin besteht, schalten Sie das Gerät aus, warten Sie mindestens 60 Sekunden und starten Sie das Gerät anschließend neu.
Der Fließzellenregler ist orange.	Die Fließzelle wurde nicht richtig platziert. Das Vakuum ist nicht dicht. Die Manifolds wurden nicht angehoben.	Entfernen Sie die Fließzelle und wiederholen Sie die Reinigungsschritte. Stellen Sie sicher, dass die Dichtungen vorhanden sind und gut sitzen. Setzen Sie die Fließzelle wieder ein. Falls die vorhergehenden Schritte nicht zum Erfolg führen, ersetzen Sie die Dichtungen und setzen Sie anschließend die Fließzelle erneut ein.
Der Fließzellenregler blinkt orange.	Das Vakuum wirkt zwar, aber unzureichend.	Entfernen Sie die Fließzelle und wiederholen Sie die Reinigungsschritte. Stellen Sie sicher, dass die Dichtungen vorhanden sind und gut sitzen. Setzen Sie die Fließzelle wieder ein. Falls die vorhergehenden Schritte nicht zum Erfolg führen, ersetzen Sie die Dichtungen und setzen Sie anschließend die Fließzelle erneut ein.
Der Fließzellenregler blinkt grün.	Der Vakuumdruck ist zufriedenstellend.	Stellen Sie den Fließzellenregler auf Position 2.
Schlechte Flüssigkeitsabgabe.	Möglicherweise Luftblasen im System.	Positionieren Sie die Fließzelle neu und überprüfen Sie, ob die Löcher nach ***unten*** zeigen. Suchen Sie im Bereich der Dichtungen nach weißen Ablagerungen. Falls Ablagerungen vorhanden sind, tauschen Sie die Dichtungen aus. Tauschen Sie die Dichtungen vor jedem Gerätewartungswaschlauf aus. Überprüfen Sie, ob die Sipper-Einheiten vollständig abgesenkt wurden und jeder Sipper in Kontakt mit den Reagenzien ist.

Durchführen einer Fluidikprüfung

Über die Schaltfläche „Check“ (Prüfung) im Begrüßungsbildschirm können Sie eine Fluidikprüfung durchführen. Verwenden Sie diese Option während der Geräteinstallation und der Behebung von Fluidik-Fehlern.

1 Setzen Sie eine gebrauchte Fließzelle in das Gerät ein.

2 Laden Sie acht SBS-Flaschen mit PW1 oder Wasser in Laborqualität und laden Sie die Flaschen auf den entsprechenden Reagenzien-Rack. Laden Sie den Rack in das Gerät.

3 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm die Option **Check** (Prüfung).

4 Wählen Sie Lösung 5 (HB2) aus der Dropdown-Liste aus. Wenn Sie eine Fluidikprüfung mit einer gebrauchten Fließzelle durchführen, wählen Sie Lösung 2, wobei es sich um Wasser handelt.

5 Geben Sie die folgenden Standardwerte ein:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Aspirationsrate): **250**
- Dispense Rate (Zufuhrrate): **2000**

6 Wählen Sie **Pump** (Pumpe). Wenn Sie die Fluidikprüfung unterbrechen müssen, wählen Sie **Pause**.

7 Inspizieren Sie die Fließzelle auf Luftblasen, die die Lanes passieren, sowie auf Undichtigkeiten in der Nähe der Manifolds.
Wenn eine erhöhte Anzahl an Luftblasen vorliegt, überprüfen Sie die Manifold-Dichtungen auf Behinderungen, senken Sie die Aspirationsrate auf 100 und pumpen Sie weitere 250 µl Wasser in die Fließzelle.

Anhalten oder Abbrechen eines Laufs

Die Optionen zum Unterbrechen bzw. Beenden eines Laufs auf dem HiSeq 4000-System unterscheiden sich von den Optionen auf anderen HiSeq-Geräten. Beim Beenden eines Laufs gibt es keine Option, Daten zu speichern oder den Lauf wieder aufzunehmen.

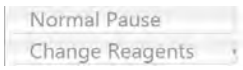
Unterbrechen eines Laufs

Sie können einen Lauf im Laufübersichtsbildschirm anhalten. Das Unterbrechen eines Laufs ist ggf. erforderlich, um die Laufkomponenten zu überprüfen oder um einen Lauf auf der benachbarten Fließzelle zu konfigurieren. Weitere Informationen finden Sie unter *Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B* auf Seite 63.

Beim vorübergehenden Unterbrechen eines Laufs kann dieser ohne Datenverlust fortgesetzt werden. RTA v2 nimmt die Verarbeitung nach der Fortsetzung eines unterbrochenen Laufs automatisch wieder auf. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Echtzeitanalyse* auf Seite 47.

1 Wählen Sie im Laufübersichtsbildschirm die Option **Pause**. Das Menü „Pause“ wird geöffnet.

Abbildung 29 Optionen im Menü „Pause“



2 Wählen Sie **Normal Pause** (Normale Unterbrechung).

3 Wählen Sie **Yes** (Ja), um die Auswahl zu bestätigen. Die Software beendet den aktuellen Vorgang und versetzt die Fließzelle in einen sicheren Status.

4 Wählen Sie **Resume** (Fortsetzen), um den Lauf fortzusetzen.

Wechseln von Reagenzien während des Laufs

Wenn Sie den Lauf mit nicht vollständig gefüllten Reagenzien starten, wählen Sie die Funktion „Change Reagents“ (Reagenzien wechseln), um den Lauf anzuhalten und die Reagenzien aufzufüllen.

1 Wählen Sie im Laufübersichtsbildschirm die Option **Pause**. Das Menü „Pause“ wird geöffnet.

2 Wählen Sie **Change Reagents** (Reagenzien wechseln).

3 Wählen Sie **Yes** (Ja), um die Auswahl zu bestätigen. Die Software beendet den aktuellen Chemie- oder Bildgebungsvorgang, versetzt die Fließzelle in einen sicheren Zustand und öffnet den Reagenzienbildschirm.

4 Geben Sie im Reagenzienbildschirm die folgenden Reagenzienparameter ein:
- Die Reagenzien-Kit-ID für neue Reagenzien.
- Die Anzahl der Zyklen, für die die Reagenzien ausreichen sollen.

HINWEIS
Im Bildschirm „Change Reagents“ (Reagenzien wechseln) ist das Kontrollkästchen für den Vorfüllvorgang deaktiviert. Das Vorfüllen der Reagenzien ist nicht erforderlich.

5 Wählen Sie **Next** (Weiter), um mit dem Laden der Reagenzien fortzufahren.

Beenden eines Laufs

ACHTUNG!
Das Beenden eines Laufs auf dem HiSeq 4000-System ist ***endgültig***.

Wenn RTA v2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert. Daher kann ein Lauf nicht fortgesetzt werden, nachdem er gestoppt wurde.

1 Wählen Sie zum Beenden des Laufs **Abort** (Abbrechen). Bestätigen bzw. brechen Sie die Ausführung des Befehls ab.
Wenn Sie den Befehl bestätigen, wird der Begrüßungsbildschirm angezeigt.

2 Fahren Sie mit dem Verfahren nach einem Lauf fort.

HINWEIS
Falls ein Lauf während Read 1 gestoppt wird, ist es möglich, eine Primer-Rehybridisierung auf dem cBot-System durchzuführen. Starten Sie nach der Primer-Rehybridisierung einen neuen Lauf auf dem HiSeq 4000-System, um die Fließzelle zu sequenzieren.

Gestaffelte Läufe auf Fließzelle A und Fließzelle B

1 Warten Sie, bis der Lauf auf der benachbarten Fließzelle einen Chemie-Schritt durchführt, und wählen Sie anschließend **Pause**. Das Menü „Pause“ wird geöffnet.

HINWEIS
Unterbrechen Sie den aktuellen Lauf immer während eines Chemie-Schrittes und nicht während eines Bildgebungsschrittes.

2 Wählen Sie **Normal Pause** (Normale Unterbrechung).

3 Warten Sie, bis der aktuelle Chemie-Schritt abgeschlossen wurde. Das System wird automatisch in einen sicheren Zustand versetzt.

4 Wenn der benachbarte Lauf angehalten wurde, richten Sie den neuen Lauf ein.

5 Sobald Sie die neue Fließzelle für den neuen Lauf geladen haben, schließen Sie die Tür der Fließzellenkammer.

6 Wählen Sie **Start**, um den Sequenzierungslauf zu starten.

7 Wählen Sie **Resume** (Fortsetzen) auf der benachbarten Fließzelle, um den unterbrochenen Lauf fortzusetzen. Die Software steuert automatisch die Chemie- und Bildgebungsverfahren auf beiden Fließzellen.

Mögliche Primer-Rehybridisierung für Read 1

Wenn die Laufkennzahlen für Read 1 niedrige Clusterzahlen oder niedrige Intensitäten zeigen oder auf andere Probleme hindeuten, können Sie eine Primer-Rehybridisierung für Read 1 durchführen, um die Fließzelle zu retten. Die Primer-Rehybridisierung für Read 1 wird auf dem cBot-System durchgeführt und beschädigt nicht die Cluster auf der Fließzelle.

Zur Durchführung einer Primerhybridisierung für Read 1 auf einer strukturierten HiSeq 4000-Fließzelle benötigen Sie folgende Verbrauchsmaterialien von Illumina:

- Hiseq 3000/4000 cBot Multi-Primer-Rehybridisierungs-Kit (Katalognr. GD-310-1001)
- HiSeq cBot-Manifold (Katalognr. SY-401-2015)

Weitere Informationen finden Sie in *Read 1-Primer-Rehybridisierung auf einer Hiseq 3000/4000-Fließzelle (Teile-Nr. 15058794).*

Index

%

%PF 52

A

Aktivitätsanzeigen 9
Ausgabelaufwerk
  Schnellformatierung 43
Ausgabeordner
  Optionaler Speicherort 18
  Standardspeicherort 10
Ausschalten des Geräts 45

B

BaseSpace
  Datenübertragung 50
  Laufüberwachung 18
  Probenblatt 11, 20
  Speicherung und Analyse 18
Begrüßungsbildschirm 8
  Befehle 9
  Menü 10
Bericht zur ersten Base 33
Berichte
  Integration der ersten Base 33
Bilder
  Miniaturbilder 18, 55
  Speichern von Bilderproben 18
  Überwachung 33
Bildschirm zur Einrichtung der Fließzelle 19

C

Chemische Schritte, Überwachung 33
Cluster nach Filterung 52
Clusterintensitäten 33

D

Datenkomprimierung 54
Datenübertragung
  Netzwerkspezifikationen 50
Dokumentation 13, 69
DoNotEject-Laufwerk 7
Doppelte Indizierung
  Auf Paired-End-Fließzelle 19
  Einstellungen im Rezepturbildschirm 19

E

Echtzeitanalyse
  Phasierung 52
  Qualitäts-Score 53
Echtzeitanalyse-Software 8
  RTA v2-Unterschiede 48
Echtzeitanalyse-Workflow 51
Empirische Phasierung 52
Erste Base bestätigen 19

F

Fehler und Warnungen
  In Ausgabedateien 50
  Statussymbole 10
Fehlerbehebung 59
  Fluidik 60
  Laden von Fließzellen 59
  Registrierung 51
Fehlerwahrscheinlichkeit 53
Fließzelle
  Einsetzen 29
  Fehlerbehebung 59
  Fließzellen-ID 19
  Fließzellenhalter 24
  Regler 30
  Schalter 25
  Strukturiert 5
  Vorbereitung 16
Fließzellenhalter
  Führungsstifte 25, 30
  Positionen der Vakuumöffnungen 24
Fließzellenkammer 3-4
Fließzellenregler
  Position 0 24
  Position 1 25, 30
  Position 2 25, 30
Fluidik, Fehlerbehebung 59-60
Fluidikkammer 3

G

Gerät ausschalten 45
Gerät in den Leerlauf versetzen 44
Gerätewaschlauf 38
Gerätezustand 10
Gestaffelte Läufe 63
Gruppierung von Q-Scores 18

H

Hilfe
  Dokumentation 13
  technisch 69
HiSeq Control Software 8

I

Indizierungsreagenzien laden 23
Indizierungsschema 20
Integration der ersten Base
  Bericht 19
  Bestätigung 33
Intensitätsextraktion 51
InterOp-Dateien 55

K

Komponenten
- Fließzellenkammer 3-4
- Fluidikkammer 3
- Optikmodul 3
- Reagenzienkammer 3

L

Laden der Reagenzien
- SBS-Position 22
- Trichterverschlüsse 22
- Wiegen 22

Laden von Fließzellen
- Fließzelle vorfüllen 25
- Luftblasen, Undichtigkeiten 27, 31
- Sequenzierungsfließzelle 30

Laden von Reagenzien
- PE-Positionen 23
- PW1 in Position 2 22
- Verbrauchsmaterialien 22

Lane-Auswahl 19
Laufkonfiguration
- Chemie-Einstellungen 19
- Indizierungseinstellungen 19
- Laden von Fließzellen 30
- Lane-Auswahl 19
- Prüfen des Flusses 27, 31
- Verbleibende Zyklen 20
- Vorfüllen der Reagenzien 20

Laufüberwachung 33
LIMS-Server 10

N

Name des Versuchs 19

O

Online-Schulungen 13
Optikmodul 3
Ordnerspeicherorte, Standardeinstellungen 10

P

Paired-End-Reagenzien, Laden 23
Phasierung, Vorphasierung 52
Phred-Skala 53
Polyklonale Cluster 52
Probenblatt
- BaseSpace 20
- Überblick 11

Protokolldatei anzeigen 10
Protokolldateien
- GlobalLog 50
- LaneNLog 50

Prüfen des Flusses, Standardwerte 27, 31

Q

Q-Scores 53
Qualitäts-Scores 53
- Gruppierung 18, 54

R

Reagenzien
- Abfall
  - Nach dem Lauf 37
- Entladen 37
- Kit-ID aufzeichnen 19-20
- Laden von Paired-End-Reagenzien 23
- Reagenzien, Bildschirm 19-20
- Vorbereitung 16
- Vorfüllen 27

Reagenzien, Bildschirm 19-20
Reagenzienkammer 3
Reagenzienpositionen
- Paired End 23
- SBS 22

Registrierung, Clusterpositionen 51
Reinheitsfilter 52
Rezepturbildschirm 19
RTA v2
- Datenübertragung 50
- Fehlerbehandlung 50
- Q-Score-Gruppierung 54
- SAV, Registerkarte „Index“ 48
- Stoppen eines Laufs, keine Fortsetzung 62

RunInfo.xml 55

S

SBS-Reagenzienposition 22
Schnellformatierung, Ausgabelaufwerk 43
Sensoranzeigen 9
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien 16
Sequenzierungsanalyse-Viewer 8
- Überblick 33

Sequenzierungsworkflow 17
Software
- Begrüßungsbildschirm 8
- Echtzeitanalyse 8
- Experiment Manager 11
- Fehlerbehebung 59
- HiSeq Control Software 8
- Info, Version 10
- Initialisierung 7
- Protokolldatei anzeigen 10
- Sequenzierungsanalyse-Viewer 8
- Vollbild anzeigen 10

Statusalarmsymbol 10
Statusseite 33
Stoppen eines Laufs 11
Stoppen eines Laufs, keine Fortsetzung 62
Strukturierte Fließzelle 5
- Cluster nach Filterung 52
- Geordnetes Array 52

Support 69
Symbole
- Fehler und Warnungen 10
- Statusalarm 10

Systemprüfung 9

T

Technischer Support 69

U

Unterbrechen eines Laufs 11

V

Verbrauchsmaterialien
    Illumina-Sequenzierungskits 16
    Vom Benutzer bereitgestellt 6
    Vorbereitung 16
Verfügbarer Speicherplatz 43
Vom Benutzer bereitgestellte
        Verbrauchsmaterialien 6
Vorfüllen
    Abfallvolumen 27
    Optionale Einstellung 20
    Vorbereitung 27

W

Wartungsprotokolle 43
Wartungswaschlauf 9, 38
Wartungswaschlauflösung
    Entsorgung 38
    Lagern 38
    Vorbereiten 38
Waschläufe
    Vorbereiten der
            Wartungswaschlauflösung 38
    Wartungswaschlauf 38
    Wasserwaschlauf 41
Wasserwaschlauf 9
    Dauer 41
    Erwartete Volumina 41
    Verbrauchsmaterialien 41
Wiegen der Reagenzien
    Nach dem Lauf 37
    Vor dem Lauf 22
Workflow
    Echtzeitanalyse 51
    Gestaffelte Läufe 63
    Sequenzierung 17

Z

Zyklen, Überwachung 33

Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

Tabelle 3 Allgemeine Kontaktinformationen für Illumina

Website	www.illumina.com
E-Mail	techsupport@illumina.com

Tabelle 4 Telefonnummern des Illumina-Kundendiensts

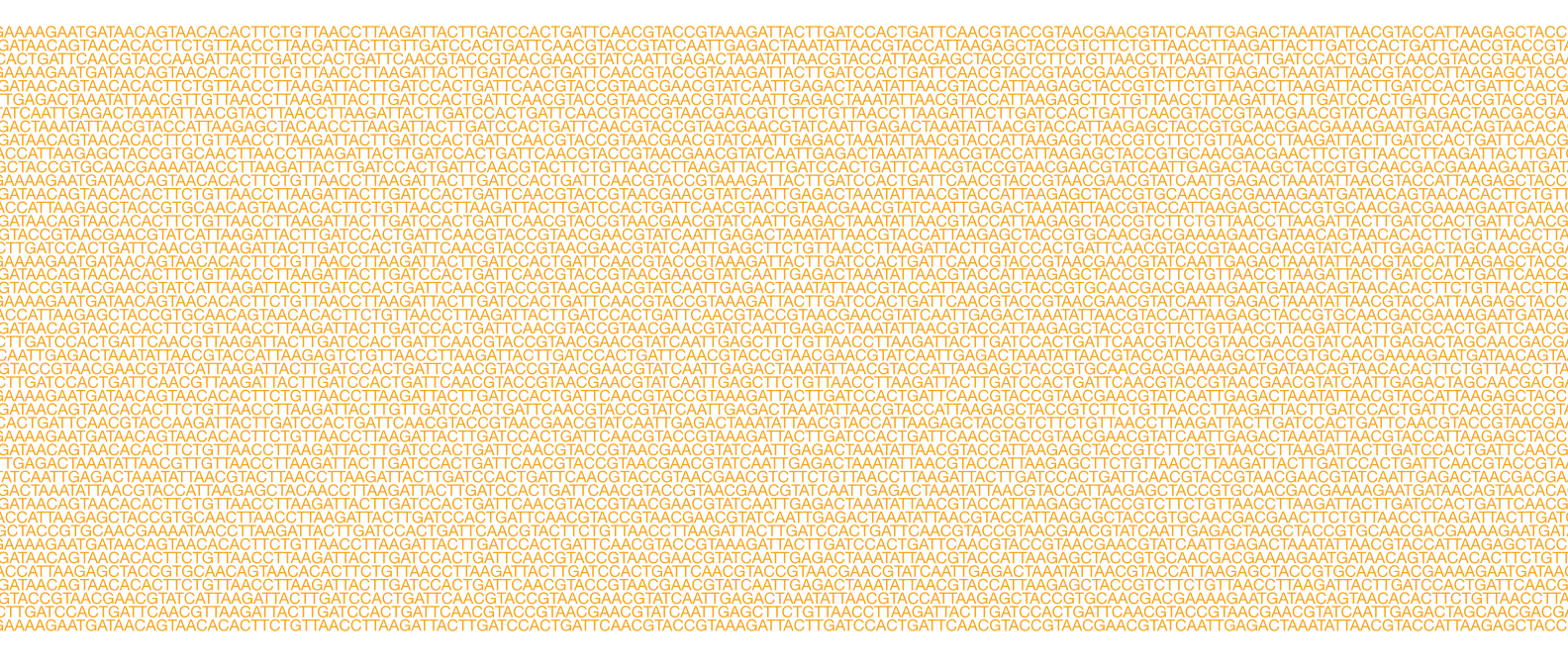
Region	Telefonnummer	Region	Telefonnummer
Nordamerika	1.800.809.4566	Italien	800.874909
Australien	1.800.775.688	Neuseeland	0800.451.650
Belgien	0800.81102	Niederlande	0800.0223859
Dänemark	80882346	Norwegen	800.16836
Deutschland	0800.180.8994	Österreich	0800.296575
Finnland	0800.918363	Schweden	020790181
Frankreich	0800.911850	Schweiz	0800.563118
Großbritannien	0800.917.0041	Spanien	900.812168
Irland	1.800.812949	Andere Länder	+44.1799.534000

Materialsicherheitsdatenblätter

Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) stehen auf der Illumina-Website unter support.illumina.com/sds.html zur Verfügung.

Produktdokumentation

Die Produktdokumentation steht auf der Illumina-Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu support.illumina.com, wählen Sie ein Produkt aus und klicken Sie anschließend auf **Documentation & Literature**.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com